

TRABAJO FIN DE GRADO: EVALUACIÓN Y DETERMINACIÓN DE METALES ESENCIALES EN NUECES



Alumno: Juan José Rodríguez Colorado

Tutoras: Dolores Bellido Milla y Estrella Espada Bellido

Grado en Química

2018-2019

TRABAJO FIN DE GRADO: EVALUACIÓN Y DETERMINACIÓN DE METALES ESENCIALES EN NUECES

Juan José Rodríguez Colorado

Grado en Química

2018-2019

MEMORIA PRESENTADA POR
JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ COLORADO
PARA OPTAR AL GRADO EN QUÍMICA

Fdo.: Juan José Rodríguez Colorado

Dra. Dña. Dolores Bellido Milla y Dra. Dña. Estrella Espada Bellido, Profesoras del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz

HACEN CONSTAR:

Que el presente trabajo de investigación titulado: **“Evaluación y determinación de metales esenciales en nueces”**, ha sido realizado, bajo su tutorización, por D. Juan José Rodríguez Colorado para optar al Grado en Química por la Universidad de Cádiz.

Y para que conste, expiden y firman la presente certificación

En Puerto Real, a 5 de diciembre de 2018

Fdo.: Dra. Dña. Dolores Bellido Milla

Fdo.: Dra. Dña. Estrella Espada Bellido

AGRADECIMIENTOS

He recorrido un largo y complicado camino para poder llegar hasta aquí y poder presentar este trabajo. Durante estos cuatro años he aprendido a solucionar problemas reales con ayuda de la química, pero pasar de la teoría a la práctica no es algo tan sencillo. Por eso, no he podido realizar este trabajo yo solo, y quiero darles las gracias a todos los que me han acompañado durante el camino.

En primer lugar, quiero agradecerles a mis tutoras Dolores Bellido Milla y Estrella Espada Bellido su dedicación y apoyo en este trabajo. Desde mi primer día de colaboración, hasta el último día de redacción siempre me habéis guiado. Es increíble lo mucho que me habéis enseñado y es algo que no puedo agradecer lo suficiente. También quiero agradecer el apoyo de María Purificación Hernández Artiga por sus ideas para perfeccionar el trabajo, las tres me habéis facilitado y apoyado muchísimo y sin vuestra ayuda no habría sido posible este trabajo.

Por otra parte, quisiera agradecer al Profesor D. Manuel García Vargas por su ayuda e indicaciones para el desarrollo del proceso experimental.

A Blas del Valle Jiménez, Técnico del Instituto de investigación vitivinícola y agroalimentario por colaborar en la determinación de algunos elementos.

También quiero agradecer a Juanjo, David, Esther, Pablo R. y Rafa, mis compañeros de laboratorio, por ayudarme siempre con cualquier problema. Mi compañero Pablo F., maestro nuecero, con quien he disfrutado mucho trabajando y mi amiga Marina, con quien me reencontré en este departamento y a quien le debo parte de mi vocación como químico. Gracias a todos vosotros.

Gracias a mis compañeros del grado, especialmente a Nacho, Fran, Ana G., Ana P., Rubén, María, Rafa, Pablo R., ... Durante estos cuatro años me habéis apoyado, me habéis sacado siempre una sonrisa y me habéis animado para que los días en la universidad fuesen un poco más divertidos.

Por otro lado, me gustaría agradecerles a mis amigos Jesús, Uli, Braza, Pepe, Pablo y Laura todo su apoyo, por sacarme de casa cuando estaba agobiado, por obligarme a trabajar cuando estaba distraído y por preocuparse de que siempre estuviera bien.

Finalmente, quiero darle las gracias a mi familia por la oportunidad de estudiar esta carrera y por haberme apoyado. Todo esto no sería posible sin vosotros. Gracias de corazón.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| 1. Resumen..... | 1 |
| 2. Abstract..... | 2 |
| 3. Introducción..... | 3 |
| 3.1. Metales esenciales en alimentos | 4 |
| 3.2. Determinación de metales esenciales en nueces | 5 |
| 3.3. Preparación de la muestra para la determinación de metales en nueces..... | 7 |
| 3.4. Determinación de metales esenciales en nueces por espectroscopía atómica | 9 |
| 4. Objetivos | 12 |
| 5. Materiales y métodos..... | 13 |
| 5.1. Reactivos | 13 |
| 5.2. Instrumentación | 13 |
| 5.3. Programas | 13 |
| 5.4. Toma de muestra | 14 |
| 5.5. Preparación de las curvas de calibrado..... | 15 |
| 5.6. Preparación de las muestras para la determinación del contenido en metales..... | 16 |
| 6. Resultados y discusión..... | 16 |
| 6.1. Adiciones estándar <i>versus</i> curva de calibrado | 19 |
| 6.2. Estudios preliminares para la medida de metales esenciales en nueces. | 20 |
| 6.3. Análisis de las muestras de nueces | 23 |
| 6.4. Información adicional para el consumidor de nueces | 34 |
| 7. Conclusiones | 36 |
| 8. Bibliografía | 37 |
| 9. Anexos..... | 40 |

1. Resumen

Las nueces son un importante componente de la dieta mediterránea y vegetariana y destacan por su contenido en lípidos, proteínas, carbohidratos, vitaminas B1, B2, B3, B6, del grupo E, polifenoles, y cabe destacar el contenido en elementos esenciales necesarios para el metabolismo humano. Sin embargo, se ha prestado poca atención a la determinación de metales esenciales en nueces haciendo necesaria una actualización de la composición mineral, así como de la preparación de materiales de referencia.

En este trabajo se determinaron metales esenciales en nueces seleccionando la espectroscopía de absorción atómica con llama como la técnica más adecuada. Los metales seleccionados fueron Fe, Mn, Cu, Na, K, Mg y Ca, dado su interés nutricional. Debido a que no existe en bibliografía un método específico de preparación de muestras de nueces para la posterior determinación de metales, se ha prestado especial interés en poner a punto un método donde la muestra quede totalmente disuelta y libre de residuos. Así, el procedimiento de digestión óptimo implicó el uso de una mezcla de HNO_3 y H_2O_2 en reactores cerrados y asistidos por microondas. Se compararon los resultados de la utilización de curvas de calibrado frente al método de las adiciones estándar, así como las condiciones instrumentales adecuadas para las determinaciones por espectroscopía de absorción atómica con llama.

Por otro lado, se realizó un amplio muestreo de nueces con distinto origen geográfico y que se encuentran disponibles al alcance del consumidor, con la finalidad de evaluar el valor nutricional de las diferentes variedades. Se llevó a cabo un estudio descriptivo de los resultados obtenidos haciendo uso de los gráficos de estrella, que permite caracterizar las distintas muestras analizadas. Por otra parte, se utilizó el análisis de la varianza para establecer diferencias entre las muestras por su diferente origen geográfico, por las prácticas agrícolas empleadas así como por su valor nutricional.

Finalmente, a modo de información adicional para el consumidor de nueces, se hizo un estudio de las características físicas y gravimétricas de las nueces muestreadas.

2. Abstract

Walnuts are an important component of the Mediterranean and vegetarian diet. They are rich in lipids, proteins, carbohydrates, vitamins B1, B2, B3, B6, vitamin E, and polyphenols and it is noteworthy to highlight the content in essential elements necessary for human metabolism. However, little attention has been paid to the determination of essential metals in walnuts making necessary the update of the mineral composition as well as the preparation of reference materials.

In this work, essential metals in walnuts were determined selecting flame atomic absorption spectroscopy as the most adequate technique. The metals studied were Fe, Mn, Cu, Na, K, Mg and Ca, because of their nutritional interest.

Due to it does not exist in the bibliography a specific method for the preparation of walnut samples for the subsequent determination of metals, special interest has been paid in setting up a method where the sample is completely dissolved and free of waste.

Thus, the optimum procedure for the digestion implied the use of a mixture of HNO_3 and H_2O_2 in closed-vessel assisted by microwaves. The results of the use of calibration curves were compared with the results obtained by the standard additions method. The appropriate instrumental conditions for determinations by flame atomic absorption spectroscopy were evaluated.

On the other hand, an extensive sampling of walnuts from different geographical origin and available to the consumer was carried out with the aim to evaluate the nutritional value of the different varieties. Star charts were employed for a descriptive study of the results obtained that allow the characterization of the different samples analyzed. Analysis of variance was used to establish differences between geographical origin, agricultural practices, and nutritional value.

Finally, as additional information for the walnut consumer, a study of the physical and gravimetric characteristics of the walnut samples was carried out.

3. Introducción

Las nueces son un fruto seco con un alto valor nutricional que han sido consumidas desde épocas prehistóricas por los humanos. Se cree que la especie *Juglans Regia* procede de Asia central, Anatolia (actualmente Turquía), el norte de Irán y del Himalaya [1]. Desde ahí, su cultivo se introdujo en Grecia, posteriormente en Italia, y durante la Edad Media, en países de toda Europa. Finalmente, en el siglo XVI se distribuyó por América [2]. Actualmente, se comercializa en el mundo entero por su interés nutricional con una producción de 1,5 millones de toneladas anuales. China es el país con mayor producción de nueces, seguido por Estados Unidos, Irán, Turquía, Ucrania, Rumanía, Francia e India, aunque en los últimos años se ha incrementado la producción en países como Chile y Argentina [3].

Las nueces son un alimento con propiedades nutricionales excepcionales que forma parte de la dieta mediterránea y vegetariana. Destacan por contener una fuente importante de ácidos grasos, que puede variar entre el 64 y el 72%. Los principales ácidos grasos que encontramos en estos frutos secos son de tipo insaturado, entre los cuales destacan el linoleico (omega-6) con un 58,3% del total de ácidos grasos, el oleico con un 15,9% y el linolénico (omega-3) con un 13,8%. Estos ácidos grasos esenciales y no producidos por nuestro organismo pueden afectar a diferentes procesos bioquímicos y fisiológicos, por lo que son beneficiosos contribuyendo a la reducción del colesterol, evitando la formación de coágulos arteriales y mejorando la presión arterial. Tienen un contenido alto en proteínas, de hasta un 24%, ricas en el aminoácido L-arginina, relacionado con la prevención de enfermedades cardiovasculares. Contienen también fibra, entre un 1,5 y 2% que ayuda al tránsito intestinal. Destacan también por su contenido en vitaminas B1, B2, B3, y especialmente B6, que interviene en el buen funcionamiento del cerebro y en la producción de glóbulos rojos, junto a la vitamina E. Presentan también alta capacidad antioxidante en parte debida a la presencia de polifenoles. Del mismo modo, contienen ácido fólico, necesario para la síntesis de ARN y ADN, previene la anemia, el cansancio y la pérdida de apetito. Además, poseen un contenido destacable en macroelementos como potasio, magnesio, calcio y fósforo, necesarios para regular la presión arterial y el desarrollo correcto del esqueleto [4,5]. También son importantes los elementos traza como hierro, manganeso y cobre, presentes en enzimas que juegan un papel importante en el metabolismo, actuando como catalizadores. Por otra parte, su bajo contenido en sodio hace de las nueces un alimento beneficioso para la salud.

Todos estos compuestos pueden contribuir de forma sinérgica, de manera que una interacción compleja y dinámica entre nutrientes y fitoquímicos parece ser el mecanismo responsable de los beneficios para la salud asociados con el consumo de nueces [6].

3.1. Metales esenciales en alimentos

La calidad de los alimentos está en la actualidad descendiendo rápidamente debido al uso de semillas híbridas, a la pérdida y empobrecimiento del suelo superficial por su explotación, a la contaminación del agua y del aire, al calentamiento global y otras formas de cambio climático. Así, cuando se determina el contenido mineral presente en las cenizas después de calcinar la materia orgánica de alimentos refinados y altamente procesados, éstos presentan valores muy bajos en contenido mineral. Es por ello que el contenido en minerales en los alimentos puede ser el mejor barómetro del valor nutricional, más que las calorías o la cantidad de proteínas que contiene, dado que un alimento es más que la suma de sus partes [7].

En 2004, “The Journal of the American College of Nutrition” confirmó que había habido un descenso estadísticamente significativo en proteínas, calcio, fósforo, hierro, riboflavina y ácido ascórbico en un muestreo en 43 cultivos de huertos [8]. Estos descensos en nutrientes pueden atribuirse a los esfuerzos en las prácticas agrícolas para obtener mayores rendimientos, velocidades de crecimiento mayores y resistencia a plaguicidas. Por otra parte, los análisis de “Official U.S. Food Composition Tables” muestran como el contenido de vitaminas y minerales de frutas y verduras han disminuido entre un 25 y 50% desde 1975 [9]. Este descenso en los resultados publicados podría también deberse a las nuevas metodologías, a muestreos limitados, a procedimientos analíticos mejorados y a avances en instrumentación analítica.

Para conocer la ingesta de nutrientes en la dieta, en muchos países se ha implantado el etiquetado de los nutrientes en los alimentos. No obstante, los valores de las etiquetas de muchos alimentos están basados en aquellos publicados en las tablas de composición de alimentos. En la mayoría de los casos la información presentada es obsoleta, creando un perfil distorsionado del valor nutricional de alimentos cotidianos. Además, al estar globalizado el mercado, los alimentos procedentes de diferentes orígenes geográficos contienen información desactualizada que llega a manos del consumidor [7].

Actualmente, se está desarrollando un nuevo sistema de etiquetado más intuitivo para el consumidor, basado en la asignación de letras y colores para clasificar los alimentos en función a su contenido en grasas, azúcares y sal, sin tener en cuenta elementos esenciales como por ejemplo Ca, Mg, P, K.... Consiste en una escala de cinco colores que van del verde (mejor

calidad nutricional) al rojo. Estos colores están asociados a cinco letras (A/B/C/D/E) que hacen que el código sea más sencillo de leer. El círculo de mayor tamaño es el que indica la calidad nutricional del alimento. En el Anexo 1 se muestra este tipo de etiquetado. El problema de este método de clasificación, desarrollado por multinacionales del sector de la alimentación como Coca-Cola, PepsiCo o Nestlé, y adaptado por el Ministerio de Sanidad de España, es que evalúa de forma independiente el contenido de estos nutrientes, sin tener en cuenta el aporte nutricional completo del alimento. Según este tipo de etiquetados, productos como el aceite de oliva virgen extra (AOVE) o los frutos secos serían clasificados como productos de color naranja, poco saludables, debido a su cantidad de grasas por cada 100 g, no obstante, productos como refrescos sin azúcar (*light*) son considerados de color verde claro al no aportar azúcares, grasas o sal [10,11]. No obstante, dado que esta clasificación deprecia alimentos tan saludables como el aceite de oliva o los frutos secos, el Ministerio de Sanidad con fecha de 17 de noviembre de 2018 aclara que *“este sistema de etiquetado frontal se implantará en alimentos compuestos por más de un ingrediente. Por ello, no es aplicable ni al aceite, la leche, la miel o los huevos, por ejemplo”* [12].

Es por tanto de interés realizar determinaciones periódicas de elementos esenciales en alimentos con vistas a evaluar la evolución de la composición con el tiempo con metodologías analíticas actualizadas.

3.2. Determinación de metales esenciales en nueces

En los últimos años, el interés en la composición elemental de materiales vegetales está creciendo como resultado del continuo desarrollo en agricultura, en nutrición, en estudios ambientales y en estudios biológicos y prospección mineral. Todos estos desarrollos han provocado un aumento en la demanda de análisis de alimentos que conllevan matrices biológicas complejas [13].

En la tabla de composición de alimentos “Nutrient Guide” que recoge datos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, del Ministerio Japonés de Educación, Cultura, Deportes, Ciencia y Tecnología, del Instituto Nacional de Alimentos de Dinamarca, de las Tablas de Composición de Alimentos para alimentos de Oriente Medio y otras fuentes nacionales e internacionales incluyendo datos de asociaciones de comercio y productores, muestra los valores nutricionales de diferentes alimentos frecuentes en la dieta mediterránea. Sin embargo, la guía no proporciona ni las técnicas instrumentales, ni los procedimientos empleados para la determinación de los elementos descritos, y los valores presentados proceden de otras bases de datos. Esta guía con valores nutricionales se utiliza para establecer

los menús en instituciones como colegios u hospitales en EE. UU. y otros países. No obstante, la información de estas tablas debe complementarse con análisis particulares y actualizados.

En el Anexo 2 se presentan datos extraídos de la “Nutrient Guide” para alimentos habituales de la dieta mediterránea. Podemos observar como los alimentos de origen vegetal y sin procesar seleccionados son ricos en K y Mg, y bajos en Na, destacando principalmente las legumbres y los frutos secos. Por el contrario, los productos lácteos tienen una relación Na/K más alta y concentraciones más bajas de Mg. En el caso de metales como Fe, Cu y Mn, éstos se encuentran en concentraciones muy bajas al tratarse de elementos traza, no obstante, las concentraciones de Fe son más altas en el caso de las legumbres, y las de Cu y Mn son más altas para los frutos secos. Por el contrario, en los lácteos la concentración de estos metales es más baja e incluso no se detecta en alguno de ellos. En el caso del Ca, podemos observar diferencias entre las diferentes verduras y legumbres con una concentración menor a la que contienen los frutos secos y los lácteos. Las nueces por su contenido en nutrientes son un alimento excelente que presentan niveles altos de K, Mg y P, y un bajo contenido en Na [7,14].

Para el caso concreto de las nueces y tras revisar la bibliografía en revistas científicas, se encontraron 6 artículos en los que se determinan elementos esenciales en nueces. Uno de ellos determina la composición mineral en nueces de dos cultivos de nogales de origen en Francia y California llevando a cabo una digestión ácida por horno de microondas con H_2SO_4 y HNO_3 y analizando los digeridos por espectroscopía de absorción atómica con llama. Se indican concentraciones entre 1,8 – 2,9 mg/100 g en Fe, 1,1 - 1,5 mg/100 g en Cu, 1,1 – 4,3 mg/100 g en Mn, 0,3 – 6,7 mg/100 g en Na, 358 – 487 mg/100 g en K, 129 – 202 mg/100 g en Mg, y 58 - 91 mg/100 g en Ca [15]. En otro de los artículos se analizan frutos secos y semillas del mercado sueco mediante espectrometría de emisión de plasma acoplado a un espectrómetro de masas (ICP-MS) y se comparan con los datos de sus etiquetas cuando están disponibles, encontrándose diferencias en algunos casos. Las concentraciones que obtuvieron fueron las siguientes: 41 µg/g de Fe, 16 µg/g de Cu, 34 µg/g de Mn, 1,8 µg/g de Na, 0,51% de K, 0,21% de Mg y 0,12% de Ca [16]. Otra publicación realiza la puesta a punto de procedimientos de preparación de la muestra para la determinación de los elementos esenciales y no esenciales en frutos secos por espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES); sin embargo, en el trabajo no se lleva a cabo el análisis de muestras reales de frutos secos sino que utilizan materiales de referencia de hojas de espinaca y de col para la aplicación del método, y aporta datos de las concentraciones de frutos secos publicados anteriormente en la bibliografía [13]. En otro de los artículos se lleva a cabo un estudio comparativo de la composición nutricional y bioactiva en cuatro cultivos de nueces, donde la determinación de

metales se llevó a cabo por espectroscopía de absorción atómica y espectrometría de emisión atómica. La concentración de los metales obtenida en los cuatro cultivos se encuentra en los siguientes rangos: 1,67 – 1,95 mg/100g de Zn, 1,5 – 2,1 mg/100 g de Fe, 0,72 – 1,49 mg/100 g de Cu, 2,03 – 3,0 mg/100 g de Mn, 1,6 – 4,8 mg/100 g de Na, 300 – 370 mg/100 g de K, 381 – 443 mg/100 g de Mg y 83 – 135 mg/100 g de Ca [6]. Otros autores comparan tres cultivos de nueces persas relacionando las propiedades físicas y químicas de las diferentes muestras. El contenido mineral fue determinado empleado espectroscopía de absorción atómica obteniéndose los siguientes rangos de resultados: 2,41 – 3,36 mg/100g de Fe, 0,65 – 1,11 mg/100g de Cu, 2,21 – 2,43 mg/100g de Mn, 1,92 – 3,02 mg/100g de Zn, 0,30 – 0,42 mg/100g de Na, 277 – 296 mg/100g de K, 71 – 94 mg/100g de Mg y 68,15 – 75 mg/100g de Ca [17]. Por último, en otro de los artículos encontrados en la bibliografía se determina el contenido mineral en legumbres y frutos secos, y se evalúa como contribuyen a la dieta española. Se empleó la espectroscopía de absorción atómica electrotermica para determinar elementos esenciales como Fe, Cu, Cr, Zn, y tóxicos como Pb, Al, Cd y Ni. En el caso de las nueces los metales tóxicos se encuentran a muy bajas concentraciones, incluso no se detectan por una técnica tan sensible como la Espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito. Los rangos de concentraciones de metales esenciales en cinco muestras de nueces fueron 20,0 – 24,4 µg/g de Fe, 20,1 – 25,6 µg/g de Cu, 0,30 – 0,38 µg/g de Cr y 25,6 – 39,7 µg/g de Zn [18].

Los resultados de la revisión bibliográfica indican una alta dispersión de las concentraciones de los elementos esenciales en nueces. Estas diferencias pueden ser debidas al muestreo, a los procedimientos de preparación de la muestra, a los procedimientos de análisis o al origen de las muestras. Ante esta situación se hace necesario el desarrollo de materiales de referencia certificados de nueces, o en su defecto de frutos secos, para asegurar la exactitud de los análisis y de los datos publicados en la bibliografía. En la actualidad sólo se dispone de muestras certificadas de vegetales cuyas matrices no son comparables a las matrices de frutos secos como las nueces en las que más de un 60% de su contenido es materia grasa.

3.3. Preparación de la muestra para la determinación de metales en nueces

En las últimas décadas se han producido avances significativos en instrumentación analítica en el campo de la determinación elemental. Se han desarrollado técnicas capaces de realizar análisis multielementales con amplios rangos de concentración y bajos límites de detección. En algunos casos, haciendo uso de técnicas acopladas (ICP-MS) [16,19]. Sin embargo, se ha prestado poca atención a la metodología de la preparación de la muestra, a pesar de que esta etapa contribuye más que la medida instrumental a los errores asociados al proceso analítico.

La determinación de metales en muestras reales requiere en muchos casos un primer paso de disolución para transformar la muestra sólida en fase líquida con o sin cambio en las especies químicas. Los objetivos que se deben tener en cuenta para la disolución de una muestra implican que los reactivos empleados deben disolverla cuantitativamente sin que queden restos insolubles y además de forma rápida. Estos reactivos utilizados no deben interferir en el proceso global de análisis. Es importante llevar a cabo el proceso sin pérdidas de analitos por volatilidad o por adsorción con las paredes del recipiente. Incluso en el caso de muestras líquidas, debido a la posible presencia de partículas en suspensión o de materia orgánica, es necesario operar utilizando procesos de filtración o de eliminación de la materia orgánica para evitar la producción de interferencias en las medidas con la técnica analítica a utilizar.

Los ácidos a emplear deben tener las propiedades necesarias para llevar a cabo la disolución de la muestra. Ácidos como el clorhídrico, fosfórico o fluorhídrico, debido a la ausencia de capacidad oxidante que presentan no serían adecuados para oxidar materia orgánica. Entre los ácidos empleados para la disolución de matrices orgánicas los más comunes son el ácido nítrico, sulfúrico o perclórico, destacando el ácido nítrico para la digestión de alimentos. Hay varias formas de aumentar las propiedades oxidantes del ácido nítrico, incrementando la temperatura, por adición de otros ácidos oxidantes o por la adición de agentes oxidantes como el permanganato de potasio, bromo o peróxido de hidrógeno, siendo este último el más utilizado ya que la acidez aumenta notablemente el poder oxidante del H_2O_2 .

Hay diferentes modos de llevar a cabo la disolución de la muestra, inicialmente la vía húmeda se realizaba con placas calefactoras sobre las que se colocaban los recipientes abiertos, dando lugar a dos principales errores, el riesgo de pérdidas y la contaminación de la muestra, además de la posibilidad de que se volatilizara el analito. Recientemente, se han venido desarrollando métodos que implican el uso de radiación microondas para llevar a cabo la digestión, siendo un procedimiento más simple y con el que no se producen pérdidas cuando se realizan en sistemas cerrados [20]. La radiación de microondas son ondas electromagnéticas que se localizan entre 300 y 300000 MHz. Esta radiación no produce cambios en la estructura molecular y origina el movimiento de las moléculas debido a la conducción iónica y a la rotación bipolar. Disolventes como el agua, ácidos minerales y algunos disolventes orgánicos tienen momentos dipolares que pueden interaccionar con el campo eléctrico aplicado, dando lugar a la rotación de los dipolos. Al dejar de aplicarse el campo eléctrico, las moléculas vuelven a su estado vibracional fundamental en un tiempo denominado de relajación, durante el cual la energía absorbida se transforma en calor. [20]

Para la descomposición de matrices orgánicas en reactores cerrados por microondas se controla la temperatura, ajustando el potencial oxidante del HNO_3 . Si la matriz se compone de carbohidratos, en los que cada C está unido a un oxígeno, su descomposición a 140°C con HNO_3 es muy sencilla. Si se compone de lípidos, con una cadena hidrocarbonada donde sólo algunos C están parcialmente oxigenados y por tanto son más difíciles de descomponer se requieren temperaturas más altas, en torno a $160\text{-}165^\circ\text{C}$. [20]

En la bibliografía, la preparación de las muestras de nueces para la determinación de elementos esenciales, con frecuencia, utiliza procedimientos obsoletos sometidos a contaminación y pérdidas, y que conllevan tiempos largos de duración [6,13,15,17,18,21]. Evidentemente tiene que existir una concordancia entre el procedimiento de preparación de la muestra y la técnica instrumental que se vaya a utilizar para la determinación. En el caso de la determinación de metales esenciales en nueces, la técnica más adecuada es la espectroscopía de absorción atómica que requiere una drástica descomposición de la matriz de la muestra ya que posee un alto contenido en grasa. A pesar de esto, en la bibliografía aparecen métodos que utilizan la calcinación o digestiones ácidas en vasijas abiertas e incluso en algunos casos no describen el procedimiento de preparación de la muestra, lo que conlleva a unos resultados poco exactos y precisos.

En este trabajo, al tratarse de una muestra sólida formada por una matriz con alto contenido en grasa, será necesario disolver y eliminar la matriz orgánica para evitar interferencias en la determinación de los analitos inorgánicos. Para ello, se utilizará una mezcla de un ácido oxidante con peróxido de hidrógeno para oxidar completamente la materia orgánica a CO_2 utilizando reactores cerrados y asistido por microondas.

3.4. Determinación de metales esenciales en nueces por espectroscopía atómica

La espectroscopía atómica abarca tres técnicas diferentes, la espectroscopía de absorción atómica (EAA), la espectroscopía de emisión atómica (EEA) y la espectroscopía de fluorescencia atómica (EFA). Por otra parte, considerando el tipo de atomización podemos diferenciar entre las más utilizadas la EAA con llama, la EAA con horno de grafito y la espectrometría de emisión de plasma acoplado inductivamente (EEA-ICP).

Para la selección de la técnica más adecuada se debe tener en cuenta, entre otros factores, los elementos que se desean medir, la concentración esperada de estos elementos en la muestra, el tipo de muestra, la precisión y la exactitud requerida.

Tanto la EAA como la EEA-ICP son adecuadas para la determinación de trazas de elementos metálicos y semimetálicos [22,23]. En general la EEA-ICP es una técnica de determinación multielemental que permite atomizar elementos que son parcialmente atomizados en la llama como por ejemplo Cr y Ti con buenos límites de detección. La EAA con horno de grafito presenta normalmente límites de detección inferiores a la EAA de llama y a la EEA-ICP, aunque requiere un mayor tiempo de análisis. Un factor importante a tener en cuenta para la elección de la técnica instrumental es la variabilidad de concentraciones en las muestras. En general, la EEA-ICP abarca rangos lineales de concentraciones mayores que la EAA, por lo que pueden medirse simultáneamente muestras con variación en la concentración.

Otros factores relacionados con la muestra que van a determinar la técnica seleccionada será la cantidad de muestra disponible. Tanto la EAA con llama como la EEA-ICP requieren que la muestra sea aspirada durante el tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio dinámico en la llama o el plasma, antes de que la señal analítica sea registrada, por lo que el volumen requerido es de varios mililitros. En el horno de grafito se requiere un volumen de muestra mucho más pequeño del orden de los microlitros.

Por último, debe considerarse el estado físico de la muestra, tanto la EAA con llama como la EEA-ICP requieren disoluciones de baja viscosidad o suspensiones finalmente dispersadas, mientras que el horno de grafito permite incluso el análisis de muestras sólidas. En algunos casos será la muestra la que limite la técnica que debe emplearse, mientras que en otros casos habrá varias técnicas adecuadas y será necesario decidir por otros factores la técnica a emplear.

La EAA es de las técnicas instrumentales que ofrecen una mayor selectividad al trabajar con espectros de línea, por lo que las interferencias espectrales están minimizadas. En cuanto a la exactitud y precisión, en EAA son interferencias fundamentalmente químicas, de absorción molecular e ionización. Sin embargo, en EEA-ICP las interferencias son de tipo espectral, ya que las químicas y de absorción molecular no se producen tanto debido a las altas temperaturas alcanzadas con el plasma. En el caso de la EAA con horno de grafito son las interferencias de matriz las que más influyen en las medidas, requiriéndose en muchos casos el uso de modificadores de matriz. Para evitar el efecto de las interferencias se utilizan patrones que sean lo más parecido posible a las muestras. De esta forma aseguramos en EAA con llama y en la EEA-ICP, que la velocidad de aspiración y las condiciones de la llama o del plasma respectivamente, sean comparables.

Los tiempos empleados en los análisis es la característica que más diferencia a las técnicas. La EEA-ICP es una técnica multielemental mientras que la EAA con llama u horno de grafito son técnicas monoelementales. Una de las ventajas de la EAA es que la optimización de las condiciones instrumentales se lleva a cabo de forma individual para cada elemento, lo que la convierte en más exacta y precisa. En contraste, la EEA-ICP está limitada ya que la optimización se realiza para un grupo de elementos requiriéndose unas condiciones de compromiso. Para la selección se debe tener en cuenta el número de elementos a determinar y el número de muestras a analizar. La EAA por llama es más rápida que la EEA-ICP para la medida de pocos elementos. La EEA-ICP requiere de un tiempo de estabilización del plasma antes de medir, por lo que es más adecuada para la medida de muchos elementos por muestra. El horno de grafito requiere poner a punto programas de temperatura más largos, por lo que sería menos apropiada para un número elevado de muestras, aunque es la técnica a elegir cuando las concentraciones de los analitos se encuentran a niveles de $\mu\text{g/L}$ en las muestras.

Por último, debe tenerse en cuenta la preparación técnica del personal y la transcendencia económica del análisis. La EAA con llama es la técnica que requiere menos preparación del personal, ya que su instrumentación es relativamente sencilla de manejar y la metodología está muy desarrollada. La EAA con horno de grafito requiere una mayor preparación ya que su metodología no está tan desarrollada y las interferencias que pueden aparecer en la medida pueden no estar cubiertas por los procedimientos de análisis, además requieren de un manejo adecuado de la muestra para evitar problemas de contaminación como consecuencia de su alta sensibilidad. La EEA-ICP se encuentra altamente automatizada, por lo que requiere una preparación media del personal, no obstante, el desarrollo de métodos con esta técnica implica buenos conocimientos de espectroscopía para poder establecer métodos libres de interferencias. En cuanto al criterio económico, la EEA-ICP es la más cara de las mencionadas y además su mantenimiento resulta más costoso debido al gran consumo de argón.

Para el caso que nos ocupa, al tratarse de analitos metálicos y en concentraciones relativamente altas a nivel de los mg/L , la técnica idónea es la espectroscopía de absorción atómica con llama, ya que es una técnica con la adecuada sensibilidad y selectividad, precisa, exacta y rápida. En este trabajo, los elementos esenciales que se determinarán en las muestras de nueces son Fe, Mn, Cu, Na, K, Mg y Ca.

4. Objetivos

El primer objetivo de este trabajo es desarrollar un procedimiento de digestión en reactores cerrados y asistido por microondas, específico para muestras de nueces.

Evaluar si existen interferencias en las medidas de los metales por la posible materia orgánica sin digerir tras la digestión de la muestra. Para ello se realizará una comparación del método de las adiciones estándar frente al método de la curva de calibrado.

Establecer las concentraciones de metales esenciales (Fe, Mn, Cu, Na, K, Mg y Ca) en muestras de nueces disponibles al alcance del consumidor.

Evaluar los resultados de forma descriptiva y utilizando técnicas estadísticas para diferenciar nueces de distintos orígenes geográficos y con vistas a valorar los beneficios en la dieta del consumidor de la ingesta de las muestras analizadas.

Por último, llevar a cabo un estudio de las características físicas y gravimétricas relacionadas con la selección de las nueces en la compra y el aprovechamiento del producto.

5. Materiales y métodos

5.1. Reactivos

Se emplearon reactivos de calidad para análisis que se presentan en la Tabla 1. Se utilizó agua bidestilada Milli-Q (18 mΩ) que se obtuvo usando un sistema de purificación de agua Millipore (Burlington, Massachusetts, Estados Unidos).

Tabla 1. Reactivos empleados

| Nombre | Concentración | Casa comercial |
|---|---------------------------|-----------------------------|
| Peróxido de hidrógeno | 30% | Panreac (Barcelona, España) |
| Ácido nítrico | 65% | Panreac (Barcelona, España) |
| Ácido sulfúrico | 96% | Merck (Darmstadt, Alemania) |
| Buffer de cloruro de cesio y cloruro de lantano | 10 g/L CsCl 100 g/L La | Merck (Darmstadt, Alemania) |
| ICP multi-element standard solution IV | 1 g/L | Merck (Darmstadt, Alemania) |

5.2. Instrumentación

La balanza que se usó para pesar las muestras de nueces era una Mettler AE 240 (Estados Unidos). La disolución de las nueces se llevó a cabo mediante un horno de microondas Ethos 1 Milestones (Italia), donde se introducen en un carrusel los reactores de teflón cerrados a presión. Mediante un panel táctil es posible controlar las condiciones de trabajo, variando la temperatura, la potencia y el tiempo de cada etapa. El análisis del contenido en metales de las muestras de nueces se realizó con un espectrómetro de absorción atómica Thermo Scientific iCE 3000 series (Estados Unidos).

5.3. Programas

Se utilizó el paquete estadístico Statgraphics Centurion XVII para la evaluación de los resultados de las concentraciones de metales esenciales en las muestras de nueces.

5.4. Toma de muestra

Para el análisis de metales en nueces se tomaron doce muestras de la especie *Juglans Regia* y una muestra de la especie *Carya Illinoensis*, ambas de la familia *Juglandaceae*.

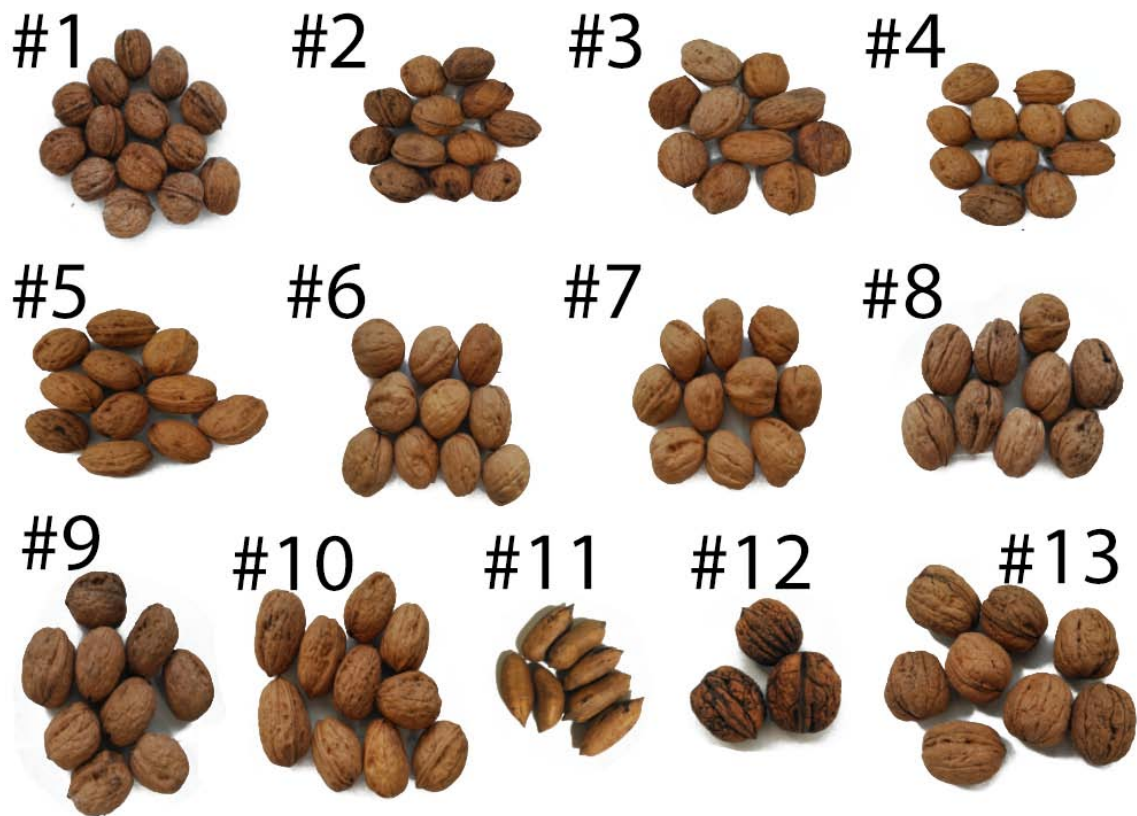


Figura 1. Muestras analizadas

En la Figura 1 se muestran las diferentes nueces muestreadas que se encuentran al alcance del consumidor y en la Tabla 2 se recogen las características y el origen de las muestras, así como información disponible en los envasados y etiquetas.

Tabla 2. Nueces muestreadas

| Muestra | Características (especie, variedad) | Origen |
|---------|--|---------------------------|
| #1 | <i>Juglans Regia</i> . Regadío. Huerta Serrano. 1100 m altura. Ecológica | Nerpio, Albacete (España) |
| #2 | <i>Juglans Regia</i> . Secano. El entredicho. 1250 m altura. | Murcia (España) |
| #3 | <i>Juglans Regia</i> . Secano. Fuente Taibilla. 1400 m altura. | Nerpio, Albacete (España) |
| #4 | <i>Juglans Regia</i> . Injerto: española+francesa. Regadío. 1100 m. | Nerpio, Albacete (España) |
| #5 | <i>Juglans Regia</i> . Franquette. | Francia |
| #6 | <i>Juglans Regia</i> . Californiana. | Estados Unidos |
| #7 | <i>Juglans Regia</i> . Californiana. | Chile |
| #8 | <i>Juglans Regia</i> . | Reus, Tarragona (España) |
| #9 | <i>Juglans Regia</i> . | Huelva (España) |
| #10 | <i>Juglans Regia</i> . Franquette. | Francia |
| #11 | <i>Carya Illinoensis</i> . Pecana. | Málaga (España) |
| #12 | <i>Juglans Regia</i> . | Lugo (España) |
| #13 | <i>Juglans Regia</i> . | Girona (España) |

5.5. Preparación de las curvas de calibrado

Todos los patrones para la construcción de las curvas de calibrado se realizaron partiendo de una disolución multielemental de 1000 mg/L de cada uno de los elementos a determinar. A partir de esta disolución se prepararon 200 mL de una disolución intermedia de concentración 50 mg/L. Para ello, se tomaron 10 mL de la disolución multielemental y se enrasaron en un matraz aforado de 200 mL con agua de calidad Milli-Q.

De la disolución de 50 mg/L se tomaron los volúmenes pertinentes para la preparación de los patrones de las curvas de calibrado de los elementos a determinar.

5.6. Preparación de las muestras para la determinación del contenido en metales

En primer lugar, se tomó una cantidad representativa de la parte comestible de las nueces de cada muestra y se trituraron hasta que se consiguiesen trozos pequeños y homogéneos de muestra. Posteriormente, se realizó una digestión ácida asistida por horno de microondas, llevándose a cabo por triplicado en tres reactores cerrados de teflón. Para ello se pesaron 0,5 g de muestra en los tres reactores de teflón. Se añadieron 6,5 mL de ácido nítrico y 1 mL de peróxido de hidrógeno. A continuación, se cerraron los vasos a presión con ayuda de una llave específica y se introdujeron en el horno de microondas con el programa establecido en dos etapas; la primera con una rampa de calentamiento hasta 200 °C durante 10 minutos y la segunda etapa a una temperatura de 200 °C durante otros 10 minutos, ambas a una potencia máxima del magnetrón de 600 W. Este método fue optimizado en función a diferentes pruebas realizadas con diferentes mezclas, volúmenes de ácidos y tiempos de digestión. Al finalizar el programa de calentamiento se dejaron enfriar los reactores a temperatura ambiente antes de abrirlos. Se transvasó su contenido a matraces aforados de 50 mL y se enrasaron con agua de calidad Milli-Q. Los digeridos enrasados se transfirieron a frascos de polietileno y se conservaron refrigerados hasta su análisis.

6. Resultados y discusión

Los nogales se encuentran presentes en suelos de origen calcáreo, granítico y metamórfico, con bajos niveles de fertilización. La diversidad de la flora presente muestra la capacidad de adaptación del nogal a biotipos muy diferentes. En ocasiones se encuentran en zonas pantanosas, pero nunca se han visto en suelos salinos. Los elementos absorbidos por el árbol y la cantidad de estos nutrientes que se encuentre presente en el fruto dependerán del origen del suelo, el pH, el agua de riego, el clima y la altitud sobre el nivel del mar [24]. Teniendo esto en cuenta, en este trabajo se ha llevado a cabo un muestreo considerando factores tales como el origen geográfico, si el cultivo es de secano o regadío, la altitud y si el nogal ha sido injertado.

Una vez seleccionadas las muestras, para la determinación de metales esenciales en nueces por espectroscopía de absorción atómica es necesario, tal como se ha comentado, tratar la muestra adecuadamente teniendo en cuenta la técnica instrumental; por lo que se hace necesario disolver la materia orgánica de la matriz de la muestra. Por ello, se llevó a cabo una digestión por vía húmeda en reactores cerrados y asistida por microondas.

Para fijar la cantidad de muestra a digerir se consideró el protocolo de digestión del equipo de microondas que indicaba un máximo de 0,5 g para muestra de semillas tales como la de girasol, también con alto contenido en grasa. Por otra parte, 0,5 g de muestra es una cantidad suficiente para la determinación de los metales esenciales de interés a bajas concentraciones en las nueces por espectroscopía de absorción atómica con llama.

En la bibliografía se ha encontrado un artículo en el que se lleva a cabo la digestión de muestras de nueces previamente desgrasadas y deshidratadas, por vía húmeda con ácido a alta presión con horno de microondas [6]. Este tratamiento hace más fácil la digestión de las muestras de nueces. No obstante, en nuestro caso preferimos no desgrasar la muestra ya que no se puede asegurar que los metales puedan estar asociados de alguna forma a la materia orgánica y por tanto a la materia grasa. De este modo disminuimos la manipulación de la muestra y la posible pérdida de analitos.

Para realizar la digestión es necesario seleccionar la mezcla ácida más adecuada. En primer lugar, se estudiaron tres tipos de mezclas ácidas en vasija abierta (matraces erlenmeyer) y calentadas en placa calefactora con el objetivo de evaluar a simple vista la capacidad para eliminar la matriz orgánica de las muestras de nueces. Estas fueron:

- 1) 5 mL H_2SO_4 + 5 mL HNO_3
- 2) 4 mL HNO_3 + 1 mL H_2SO_4 + 1 mL H_2O_2
- 3) 7 mL HNO_3 + 1 mL H_2O_2

Las digestiones se llevaron a cabo durante tres horas al 100% de potencia de la placa calefactora. Las mezclas que contenían H_2SO_4 dejaron al finalizar la digestión, un residuo negro carbonoso debido a la oxidación incompleta de la materia orgánica. El digerido con HNO_3 + H_2O_2 presentaba un aspecto más claro y transparente. No obstante, en los tres matraces quedaban restos de grasa sin digerir.

A la vista de los resultados se eligió la mezcla HNO_3 + H_2O_2 para realizar la digestión de las nueces en sistema cerrado y asistido por microondas. El siguiente paso fue determinar el volumen de reactivos y el tiempo necesario de digestión para eliminar al máximo posible, los restos de materia orgánica. Estos restos pueden interferir de forma importante en la determinación de elementos tales como hierro, cobre y manganeso.

Se programaron una serie de experiencias con diferentes volúmenes de ácido nítrico (5, 6 y 7 mL) y diferentes tiempos de digestión (20 y 30 min) para la muestra #1. Una vez realizadas las digestiones, los digeridos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se trasvasaron a un

matraz aforado de 50 mL donde se enrasaron con agua de calidad Milli-Q. Para evaluar los resultados de las diferentes digestiones realizadas, se seleccionó como analito el Fe dado que es el que tiene mayor capacidad para formar complejos con la materia orgánica. La determinación de hierro en estos digeridos se llevó a cabo mediante la espectroscopía de absorción atómica con llama de aire-acetileno. Las condiciones instrumentales de las medidas de los patrones y los digeridos fueron previamente optimizadas con un patrón de 1 mg/L de una disolución multielemental que contenía hierro. Con los parámetros instrumentales optimizados, se construyó una curva de calibrado con patrones acuosos de concentraciones 0,2; 0,5; 1 y 2 mg/L de Fe preparados a partir de una disolución multielemental. En la Tabla 3 se recogen las condiciones y los resultados para los diferentes experimentos llevados a cabo por triplicado.

Tabla 3. Concentraciones de Fe para la muestra #1 con diferentes condiciones de digestión.

| Experimento | V _{HNO₃} (mL) | Tiempo (min) | [Fe] (mg/kg de nuez) | Coef. Variación (%) |
|-------------|-----------------------------------|--------------|----------------------|---------------------|
| 1 | 5 | 20 | 13,79 | 19,1 |
| 2 | 6 | 20 | 16,69 | 5,6 |
| 3 | 7 | 20 | 16,55 | 14,8 |
| 4 | 5 | 30 | 16,78 | 5,8 |
| 5 | 6 | 30 | 15,64 | 8,0 |
| 6 | 7 | 30 | 15,18 | 7,6 |

Se realizaron digestiones a 20 y 30 minutos en base al tiempo recomendado (30 min) en el protocolo de digestión de semillas del horno de microondas. En cuanto al volumen de ácido nítrico se probaron 5, 6 y 7 mL manteniendo constante el volumen de peróxido de hidrógeno en 1 mL, dado que el procedimiento de digestión para semillas propuesto por el manual del horno de microondas es de 7 mL de HNO₃ + 1 mL de H₂O₂.

Los resultados indican que los mayores valores de concentración de Fe se obtuvieron para los digeridos de 20 minutos con 6 y 7 mL de HNO₃, y de 30 minutos con 5 mL de HNO₃, aunque se observaron diferencias en los coeficientes de variación.

Se realizó una prueba adicional en la que se añadió un volumen de 6,5 mL de HNO₃ + 1 mL de H₂O₂ con un tiempo de digestión de 20 minutos, obteniéndose una concentración de hierro de 17,14 mg/kg con un coeficiente de variación del 5,4%. Estas condiciones proporcionan el valor más alto de concentración de hierro en la muestra de nueces, con el mejor coeficiente de variación. Por tanto, a partir de este momento, la digestión de las muestras de nueces en reactores cerrados y asistida por microondas se realizará adicionando 6,5 mL de HNO₃ + 1 mL

de H_2O_2 con el siguiente programa de temperatura. En la Figura 2 se representa el programa de temperatura del horno de microondas a una potencia de 600 W.

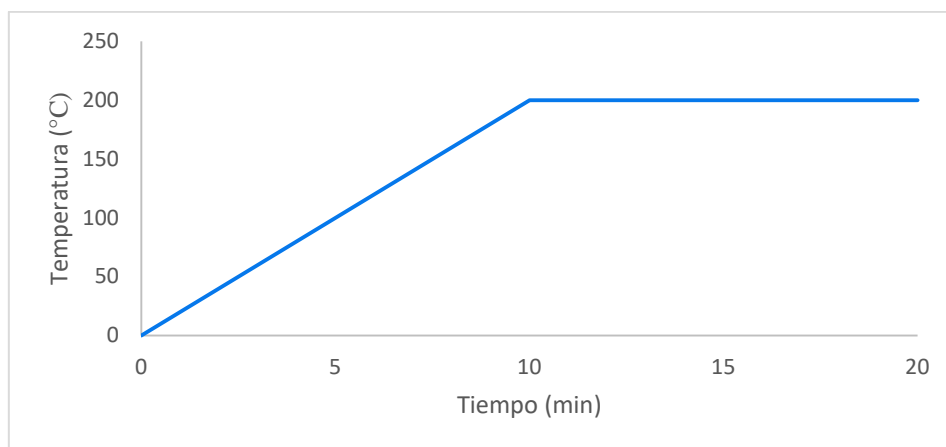


Figura 2. Programa de temperatura del horno de microondas para la digestión de las muestras

6.1. Adiciones estándar *versus* curva de calibrado

Para asegurar que tras las digestiones de las muestras de nueces no quedan restos de materia orgánica que puedan interferir en la medida de los metales, se realizó un estudio comparativo utilizando el método de la curva de calibrado frente al método de las adiciones estándar. En el método de la curva de calibrado se prepararon los patrones a partir de disoluciones acuosas del metal a determinar. En el caso del método de las adiciones estándar se prepararon patrones que contenían la misma cantidad de muestra (0,5 g) y a los que se les añadió cantidades crecientes de la disolución multielemental y los reactivos necesarios para la digestión, de forma que los analitos exógenos estuvieran sometidos al mismo tratamiento que los analitos endógenos de la muestra de nueces [25]. El método de adiciones estándar puede ser aconsejable en los casos de muestras con matrices difícilmente reproducibles en los patrones, como por ejemplo, muestras de alimentos, biológicas o de medio ambiente, aunque éstas hayan sido previamente digeridas. Para comparar este método con el método de la curva de calibrado se prepararon los patrones para el método de las adiciones estándar con concentraciones 0,1; 0,2; 0,4 y 0,6 mg/L y se elaboró una curva de calibrado para Fe con patrones de 0,2; 0,5; 1 y 2 mg/L preparados a partir de la disolución multielemental. En la Figura 3 se muestran las gráficas correspondientes a los dos métodos aplicados.

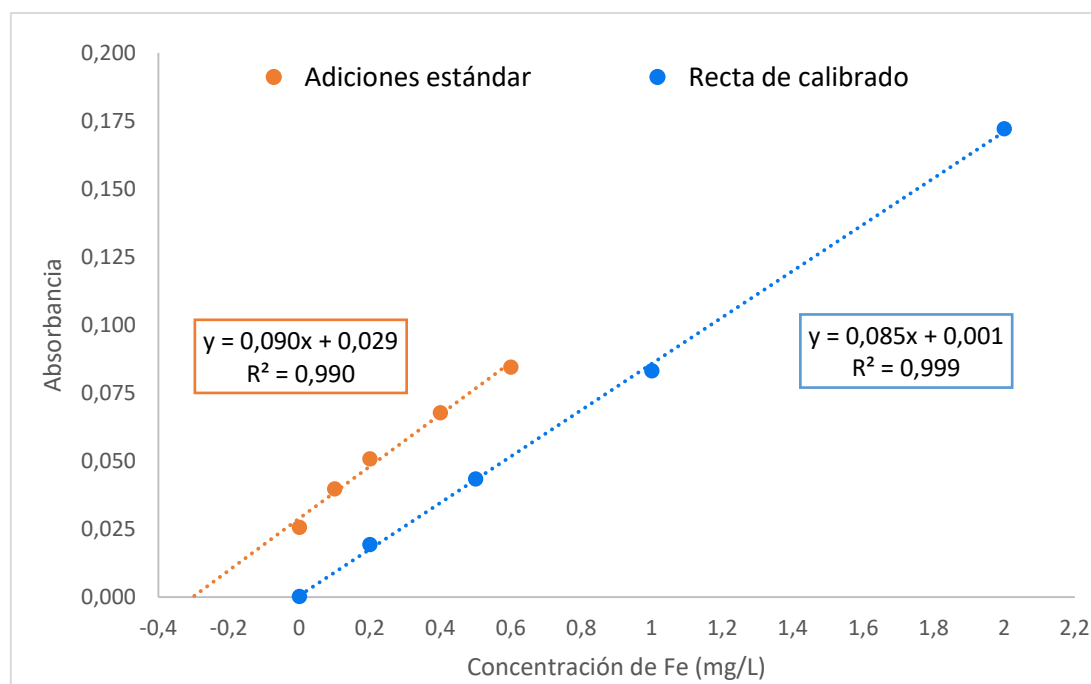


Figura 3. Adiciones estándar frente a curva de calibrado.

Si la recta obtenida por el método de las adiciones estándar tiene la misma pendiente que la recta de calibrado, se acepta que el resultado por interpolación sobre la recta de calibrado con patrones es adecuado. Si las dos pendientes son distintas, se deduce que existe alguna interferencia en la matriz de la muestra, y por tanto, no es correcta la comparación de patrones y muestras [25]. En la Figura 3 podemos observar dos rectas cuyas pendientes son prácticamente iguales, por lo que podemos deducir que la digestión propuesta en este trabajo elimina adecuadamente la materia orgánica de las muestras de nueces. Por otra parte, la determinación de metales esenciales en digeridos de nueces se llevará a cabo utilizando curvas de calibrado preparadas con patrones acuosos, ya que este procedimiento es más sencillo y rápido en comparación con el método de las adiciones estándar.

6.2. Estudios preliminares para la medida de metales esenciales en nueces.

Metales traza tales como Fe, Cu y Mn se seleccionaron dado su interés por ser esenciales para muchas enzimas importantes que desempeñan papeles como catalizadores, contribuyendo al metabolismo en el cuerpo humano [17]. Por otro lado, macroelementos como Ca, Mg, Na y K contribuyen al correcto funcionamiento del organismo. Ca y Mg son indispensables para el desarrollo y funcionamiento del sistema óseo. Na y K son responsables de la contracción muscular y la transmisión de impulsos nerviosos. De igual modo, Mg y K pueden mejorar la presión arterial, además de que bajos niveles de Mg pueden contribuir a generar problemas de corazón e hipertensión.

Por lo tanto, determinar la concentración en la que se encuentran todos estos elementos esenciales en las nueces es de gran interés al tratarse de un alimento de fácil acceso de la dieta mediterránea.

Los metales tóxicos no han sido incluidos en este trabajo dado las características especiales de este tipo de alimento. Durante el desarrollo del fruto, la parte comestible de éste se encuentra aislada del medio al estar cubierta por la cascara, lo cual mantiene al fruto protegido de la contaminación exterior del aire y del polvo del suelo. De esta forma metales pesados y tóxicos no pueden depositarse sobre la nuez [16]. Esto puede corroborarse con los resultados obtenidos en la bibliografía de metales como Pb, Cd o Hg, en los que la concentración se encuentra por debajo de los niveles de toxicidad.

Una vez que se ha establecido el procedimiento de digestión de las muestras de nueces, el siguiente paso fue la optimización de las condiciones instrumentales de medida de los metales que se determinarán en dichas muestras.

Las curvas de calibrado se prepararon con patrones acuosos para todos los metales seleccionados. En cada caso se utilizó la longitud de onda principal de cada elemento y se optimizaron los parámetros instrumentales. Así, se evaluaron la altura de mechero, flujo de combustible, posición de la bola de impacto y la anchura de rendija. En la Tabla 4 se recogen los valores de los parámetros instrumentales optimizados para cada elemento.

Tabla 4. Parámetros instrumentales.

| Metal | λ (nm) | Altura de mechero (mm) | Flujo combustible (L/min) | Anchura de rendija (nm) |
|--------------|----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| Fe | 248,3 | 10,2 | 1,2 | 0,2 |
| Cu | 324,8 | 7,8 | 1,0 | 0,5 |
| Mn | 279,5 | 8,6 | 1,2 | 0,2 |
| Na | 589,0 | 7,0 | 1,0 | 0,2 |
| K | 766,5 | 7,0 | 1,1 | 0,5 |
| Mg | 285,2 | 8,6 | 1,0 | 0,5 |
| Ca | 422,7 | 7,0 | 1,5 | 0,5 |

En todos los casos se utilizó la llama de aire-acetileno. Esta llama es la recomendada para la medida de todos los metales excepto para Ca. La llama recomendada para la medida de Ca es la llama de nitroso-acetileno, dado que el Ca es un elemento que se atomiza con mayor dificultad en llamas menos energéticas perdiendo sensibilidad en la medida. En nuestro caso,

se pudo medir el Ca con llama de aire-acetileno por encontrarse a altas concentraciones en las muestras de nueces.

Por otra parte, en la medida del Ca los oxoaniones como el fosfato, aluminato o silicato pueden actuar formando sales e interfiriendo en la medida, disminuyendo la señal, por lo que se utilizó un agente liberador para eliminar la posible interferencia espectral. Se añadió una concentración del 0,1% (m/v) de Lantano tanto en muestras como en patrones para eliminar la interferencia que podría producir el fosfato al encontrarse en las muestras de nueces en altas concentraciones [15,16].

En el caso de Na y K la llama de aire-acetileno puede provocar la ionización de estos elementos dando lugar a una disminución de la señal. Por esta razón es necesario añadir un supresor de la ionización de Cs al 0,2% (m/v) en muestras y patrones que, al ser más fácilmente ionizable, evita la ionización de Na y K en la llama. Hay que señalar que según la bibliografía Na y K se podrían haber medido por EEA que no precisa la lámpara de cátodo hueco como fuente de radiación, pero existe experiencia en el grupo de investigación de que la determinación por EAA proporciona rectas de calibrado con mejores pendientes y ajustes lineales por lo que se obtienen resultados más precisos.

Para todos los elementos se evaluó el rango lineal de las curvas de calibrado. Las curvas de calibrado se realizaron empleando las condiciones instrumentales anteriormente descritas y obteniéndose en todos los casos un buen ajuste lineal, con coeficientes de correlación mayores a 0,990.

En la Tabla 5 se muestran las concentraciones de los patrones utilizados en la construcción de las curvas de calibrado para cada elemento.

Tabla 5. Concentraciones de los patrones para la determinación de cada elemento.

| Elementos | Concentración de los patrones (mg/L) |
|-----------|--------------------------------------|
| Fe | 0,2; 0,5; 1 y 2 |
| Cu | 0,05; 0,1; 0,2 y 0,5 |
| Mn | 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 y 1 |
| Na | 0,05; 0,1 y 0,2 |
| K | 0,1; 0,2; 0,5 y 1 |
| Mg | 0,05; 0,1; 0,2 y 0,5 |
| Ca | 0,2; 0,5; 1; 2 y 2,5 |

6.3. Análisis de las muestras de nueces

Para poder llevar a cabo un estudio sobre los metales esenciales en las nueces se realizó un muestreo de las nueces que se encuentran al alcance del consumidor. De este modo se recogieron muestras de diferentes orígenes geográficos, de diferentes cultivos y en diferentes suelos y condiciones climáticas, lo cual podría generar diferencias en su composición. Concretamente, el origen geográfico de las muestras de nueces *Juglans Regia* es Chile, Francia, España y Estados Unidos. Las muestras de origen nacional son de Girona, Huelva, Lugo y la Sierra de Segura, habiéndose realizado en esta última localización un muestreo más específico de cuatro cultivos diferentes, a distinta altitud, forma de riego (secano o regadío) y con un cultivo autóctono injertado con una variedad francesa. Por otro lado, también se seleccionó una muestra de la especie de nuez *Carya Illinoensis*, también conocida como nuez pacana o pecana, procedente de Málaga que serviría de contraste con el resto de las nueces del género *Juglans Regia*.

Tras la digestión de las muestras empleando el procedimiento puesto a punto en este trabajo en reactores cerrados y asistido por microondas, se llevó a cabo la determinación de los metales seleccionados por espectroscopía de absorción atómica con llama. Para ello, se prepararon los correspondientes patrones acuosos de cada metal con el fin de construir las curvas de calibrado.

En la Figura 4 se muestran las curvas de calibrado utilizadas para las determinaciones de todos los elementos en las muestras de nueces.

Como puede observarse, en todos los casos se han obtenido curvas de calibrado con buenos ajustes lineales con coeficientes de correlación por encima de 0,99, lo que indica que los patrones preparados pertenecen al tramo recto de la curva de calibrado. En los casos de Na, K y Mg las mayores pendientes indican una mayor sensibilidad de calibrado. En el caso del Ca se obtuvo una pendiente menor como consecuencia del uso de la llama aire-acetileno, lo que reduce considerablemente su sensibilidad.

Con estas curvas de calibrado se llevaron a cabo las medidas de los triplicados de las 13 muestras de nueces. En la Tabla 6 se muestran los valores medios (en mg/kg) junto a los coeficientes de variación de los diferentes metales para cada una de las muestras.

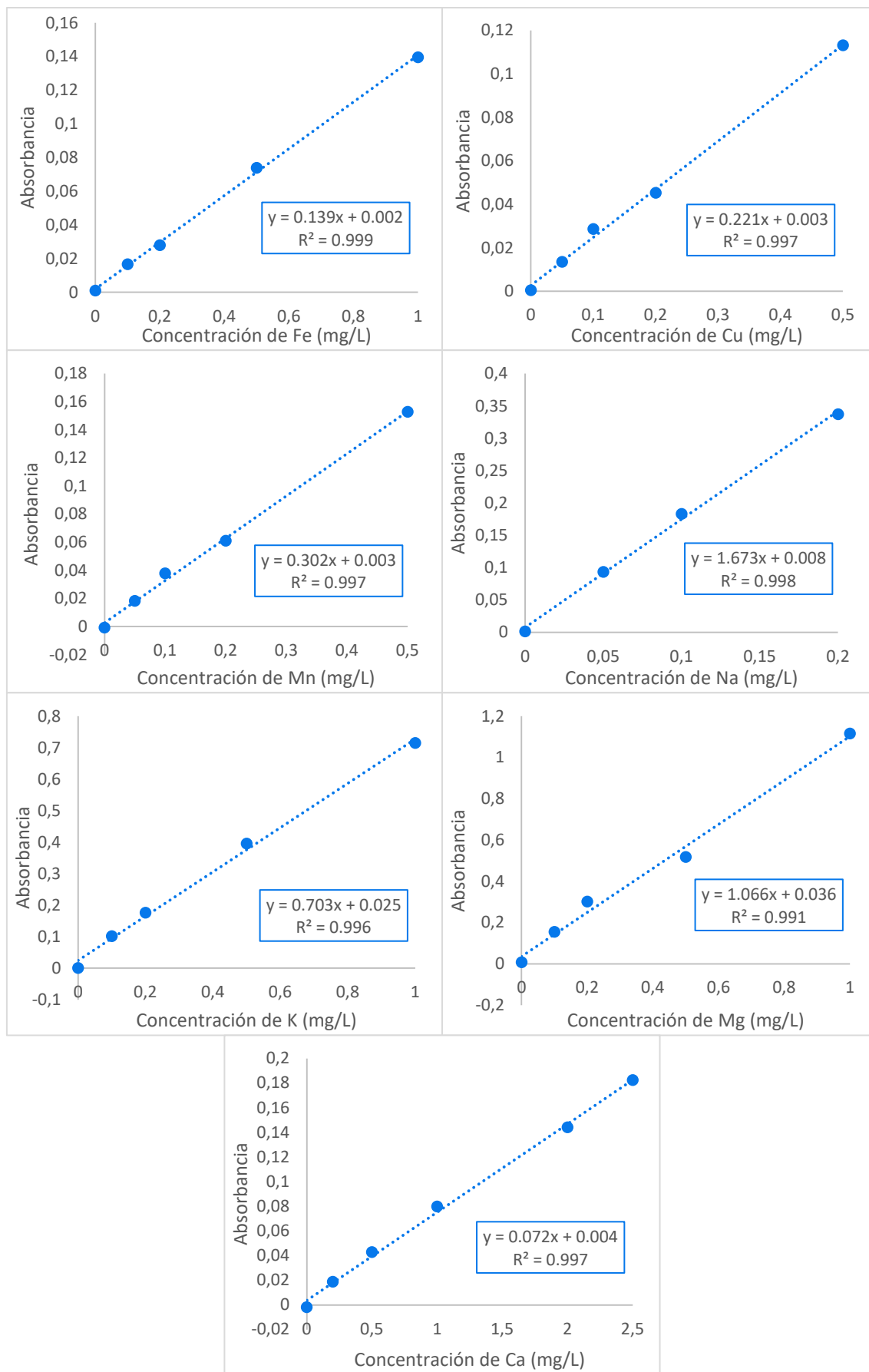


Figura 4. Curvas de calibrado para cada elemento

Tabla 6. Resultados medios de metales esenciales en nueces y coeficientes de variación.

| Muestra | [Fe] mg/kg | %CV | [Mn] mg/kg | %CV | [Cu] mg/kg | %CV | [Na] mg/kg | %CV | [K] mg/kg | %CV | [Mg] mg/kg | %CV | [Ca] mg/kg | %CV |
|----------------------------|---------------|-----|---------------|------|---------------|-----|---------------|------|--------------|-----|---------------|-----|---------------|-----|
| #1 (Nerpio, regadío, J.R.) | 17,14 | 5,4 | 19,64 | 7,0 | 6,15 | 0,4 | 11,42 | 7,6 | 3437,26 | 4,9 | 1335,75 | 4,5 | 625,82 | 9,2 |
| #2 (Murcia, J.R.) | 17,34 | 1,8 | 25,09 | 13,0 | 7,32 | 2,7 | 10,67 | 8,9 | 3513,51 | 2,1 | 1251,48 | 4,5 | 536,79 | 4,4 |
| #3 (Nerpio, seco, J.R.) | 17,37 | 4,4 | 15,37 | 4,9 | 5,87 | 8,5 | 9,28 | 2,8 | 3206,48 | 2,5 | 1233,93 | 2,3 | 626,56 | 5,0 |
| #4 (Injerto, J.R.) | 14,16 | 2,0 | 8,01 | 8,9 | 6,29 | 6,0 | 10,26 | 8,4 | 2993,16 | 1,8 | 1194,78 | 2,8 | 403,35 | 6,0 |
| #5 (Francia, J.R.) | 15,84 | 2,5 | 22,81 | 12,8 | 5,46 | 8,9 | 10,34 | 8,7 | 3307,98 | 2,0 | 1150,49 | 2,1 | 351,95 | 2,2 |
| #6 (California, J.R.) | 18,31 | 0,7 | 23,78 | 2,2 | 6,26 | 1,2 | 13,36 | 11,8 | 3285,76 | 1,5 | 1203,58 | 2,0 | 383,53 | 2,2 |
| #7 (Chile, J.R.) | 20,28 | 2,0 | 15,50 | 1,6 | 9,74 | 3,2 | 24,51 | 3,0 | 3247,73 | 1,4 | 1302,16 | 0,7 | 338,39 | 0,3 |
| #8 (Reus, J.R.) | 20,75 | 3,5 | 38,58 | 1,1 | 9,93 | 1,3 | 12,13 | 2,8 | 3247,86 | 1,2 | 1135,62 | 1,0 | 518,40 | 3,3 |
| #9 (Huelva, J.R.) | 17,57 | 4,0 | 11,27 | 6,4 | 7,31 | 5,6 | 11,68 | 5,4 | 3182,41 | 1,1 | 1206,48 | 1,3 | 471,74 | 2,8 |
| #10 (Francia, J.R.) | 16,45 | 0,5 | 31,14 | 1,2 | 9,88 | 4,0 | 8,60 | 10,7 | 3387,98 | 1,7 | 1124,58 | 1,0 | 550,74 | 8,6 |
| #11 (Málaga, C.I.) | 16,82 | 3,1 | 2,23 | 14,0 | 4,71 | 4,6 | 11,60 | 2,5 | 4799,72 | 0,7 | 1074,74 | 5,2 | 237,66 | 4,6 |
| #12 (Lugo, J.R.) | 18,06 | 5,0 | 30,04 | 6,7 | 4,19 | 3,3 | 10,47 | 10,2 | 3993,65 | 2,9 | 1254,68 | 1,3 | 166,92 | 1,2 |
| #13 (Girona, J.R.) | 15,28 | 7,1 | 25,86 | 13,3 | 6,83 | 1,5 | 11,80 | 5,1 | 3420,29 | 2,9 | 1130,84 | 1,7 | 353,49 | 5,6 |

J.R.: *Juglans Regia*; C.I.: *Carya Illinoensis*

En primer lugar, en la Tabla 6 podemos hacer una diferenciación de dos grupos de elementos, los macroelementos con concentraciones más altas como K, Mg y Ca, y los elementos traza con concentraciones más bajas como Fe, Cu, Mn y Na. Si establecemos el orden en las concentraciones de los elementos sería $Cu < Na < Fe < Mn < Ca < Mg < K$. Las concentraciones para todos los metales determinados se encuentran en los rangos publicados en la bibliografía [6,13,15–18].

Por simple inspección de los resultados, para las nueces *Juglans Regia* se observa que para el caso del Fe la concentración más baja la presenta la muestra #4 que se trata de un injerto de nuez del país con nuez francesa, y las más altas las muestras #7 y #8 de Chile y Reus respectivamente. Para el Mn el rango es más amplio partiendo de la muestra #4 correspondiente a la nuez injertada con la concentración más baja y con el nivel más alto para la muestra #8 de Reus. En el caso del Cu, la muestra que presenta la concentración más baja es la #12 cuyo origen es Lugo, mientras que las muestras con mayor concentración son la #7, #8 y #10, esta última de origen francés. Para el Na la muestra #10 tiene la concentración más baja mientras que la muestra #7 presenta una concentración 3 veces superior. El K se encuentra en menor concentración en la muestra #4 de injerto y más concentrado en la muestra #12. En el caso del Mg, éste se encuentra en menor concentración en la muestra #10 y en mayor concentración en las muestras #1 de Nerpio y #7 de Chile. Finalmente, para el caso del Ca las concentraciones más altas las presentan las muestras #1 y #3 ambas de Nerpio, de regadío y secano respectivamente y las más baja en la muestra #12. En el caso de la muestra #11 (nuez pecana) presenta las menores concentraciones para Mn, Cu, Mg y mayor concentración en K.

Con estos datos podemos destacar efectos beneficiosos para la salud de la ingesta de nueces. Así, una alta relación K/Na y alto contenido en Mg es beneficioso para reducir la hipertensión y los problemas de corazón. Por otra parte, el alto contenido en Ca indica que son una buena fuente de este metal para el desarrollo y conservación del sistema óseo.

A continuación, en la Figura 5 se muestran los diagramas de estrella para cada una de las muestras. El diagrama de estrella consiste en una representación gráfica que permite visualizar el conjunto de resultados estandarizados y permite caracterizar y comparar las diferentes muestras en función a la forma de la estrella. La forma que adopta la estrella es única para cada muestra, ya que depende de las concentraciones de los metales que la componen y del conjunto.

La estandarización da escala a la dimensión de cada polígono, para ello a cada resultado de cada elemento en una muestra se le resta la media de los resultados de todas las muestras

para ese elemento y se divide por la desviación estándar de todas las muestras para ese elemento. El cálculo se establece a partir de la siguiente ecuación:

$$L = \frac{x_{ij} - \bar{x}_j}{s_j}$$

Donde L es la desviación de la concentración de un metal respecto a la media, x_{ij} es la concentración de un metal en una muestra, \bar{x}_j es el valor medio de las concentraciones de todas las muestras para un metal, y s_j es la desviación estándar de las concentraciones de todas las muestras para un metal.

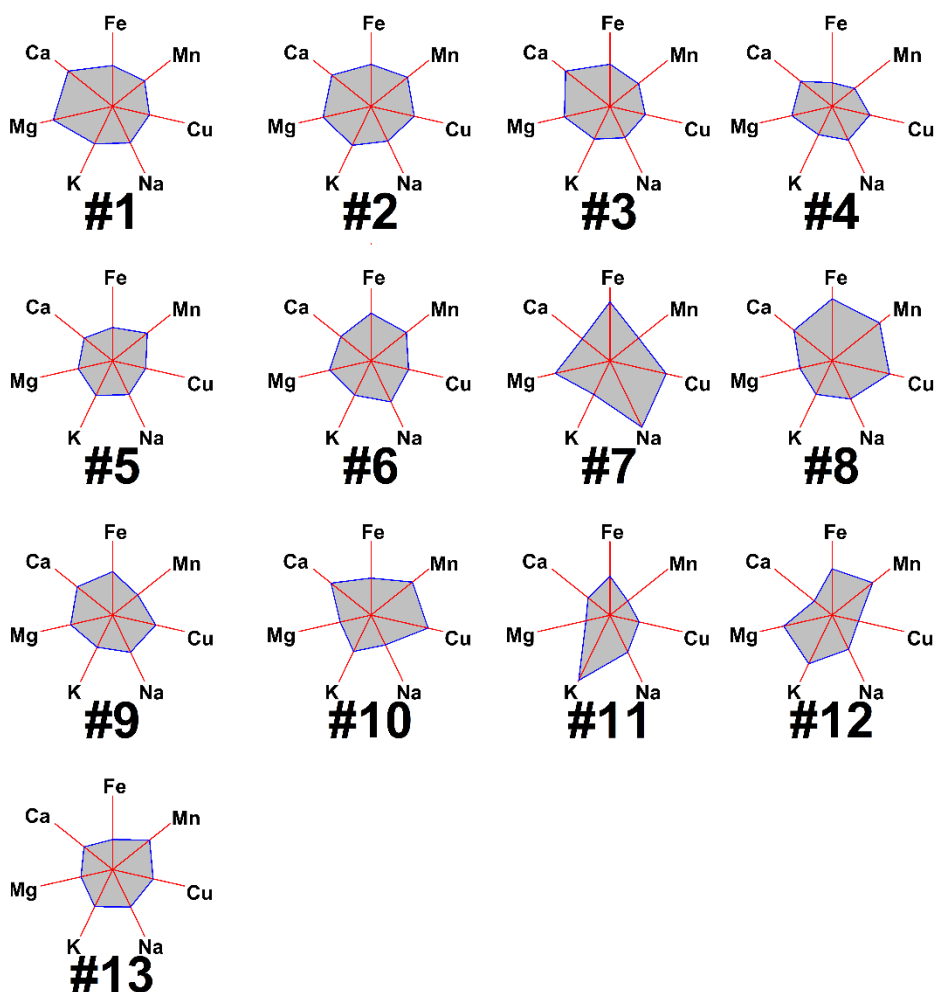


Figura 5. Diagramas de estrella para las muestras.

Como se puede observar, las muestras difieren a primera vista ya que tienen formas muy distintas entre sí. Por otra parte, se aprecian similitudes entre las muestras #1, #2 y #3 procedentes de la misma zona geográfica. La muestra #7 de origen Chile alcanza los niveles más altos de Na, además de niveles altos en Fe y muy bajos en Ca y K. La muestra #8 tiene el contenido más alto en metales traza, aunque presenta niveles bajos para los macroelementos.

La muestra #9 de origen Huelva presenta valores intermedios para todos los metales. La muestra #11 correspondiente a la nuez pecana tiene un nivel muy bajo en todos los metales excepto en K, en la que destaca por presentar el nivel más alto. La muestra #12 tiene unos niveles intermedios en todos sus elementos excepto Ca y Cu, presentando los valores de concentración más bajos de todas las muestras para estos elementos. Por último, se observa que la muestra #4 que corresponde a un injerto, la muestra #5 de origen francés, la muestra #6 de nuez californiana, y las muestras #9 y #13 de origen español de Huelva y Girona respectivamente, son las muestras que presentan una forma más uniforme y las menores concentraciones para todos los elementos.

Una vez finalizado el estudio descriptivo de los resultados, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA). El análisis de la varianza determina diferencias estadísticamente significativas entre las medias aritméticas de una variable por comparación de varianzas. Así, el análisis de la varianza desglosa la variación total en fuentes diferentes, se puede comparar la varianza debida a la variabilidad de grupos con la que es debida a la variabilidad de las réplicas. Para diferenciar una media aritmética de otra se utilizó el procedimiento de las mínimas diferencias significativas de Fisher con una probabilidad $p = 0,05$. En Química Analítica el análisis de la varianza se ha utilizado extensamente en evaluaciones de ejercicios de intercalibración y para la interpretación de los resultados de ensayos colaborativos [26–29].

En este trabajo, se utilizó el ANOVA para establecer diferencias entre nueces de la especie *Juglans Regia* de diferentes orígenes (españolas, francesas y americanas) a partir de las concentraciones de los elementos determinados. En la Tabla 7 se resumen los estadísticos del ANOVA.

Tabla 7. Tabla del ANOVA.

| Elemento | Razón-F | Valor-p |
|----------|--------------|---------------|
| Fe | 5,48 | 0,0088 |
| Mn | 1,22 | 0,3086 |
| Cu | 1,56 | 0,2261 |
| Na | 25,46 | 0,0000 |
| K | 0,44 | 0,6469 |
| Mg | 5,48 | 0,0088 |
| Ca | 1,44 | 0,2509 |

Teniendo en cuenta el factor origen, los tres valores-p inferiores a 0,05 muestran diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de diferente origen a un nivel de confianza del 95%. El resto de los metales con un valor-p superior a 0,05 no muestran diferencias

estadísticamente significativas entre nueces de diferente origen. El uso del valor-p como único criterio estadístico a la hora de establecer diferencias ha sido criticado en la bibliografía debido a frecuentes errores de interpretación, que normalmente conlleva a clasificar los efectos de forma binaria (significativos o no significativos), sin tener en cuenta la intensidad que éstos puedan tener [30]. Es por ello que para complementar la discusión de los resultados se recurre al cociente F. Este parámetro es el valor experimental usado para el test-F que relaciona los cuadrados medios de cada factor con el cuadrado medio del error total. Se trata, por tanto, de una comparativa entre varianzas, utilizada para identificar la existencia de diferencias significativas entre ambas. Los efectos menos significativos son aquellos cuya razón entre varianzas adopte un valor más bajo, mientras que aquellos efectos con mayor influencia alcanzarán un mayor valor del cociente F. Por lo tanto, dados los valores de la razón-F las concentraciones de Fe, Na y Mg diferencian de forma significativa a las nueces con diferente origen. En la Figura 6 se muestran los intervalos de confianza para los tres grupos de nueces.

Como se observa, las nueces americanas se diferencian significativamente por un mayor contenido en Fe y Na en comparación con las españolas y francesas. Mientras que las nueces de origen francés presentan un menor contenido en Mg. No existen diferencias significativas entre las nueces de origen español y francés para Fe y Na, así como tampoco existen diferencias entre las nueces españolas y americanas para el contenido en Mg. Un bajo contenido en Na y un alto contenido en Mg es un indicativo de un alimento de alta calidad, como es el caso de las nueces españolas.

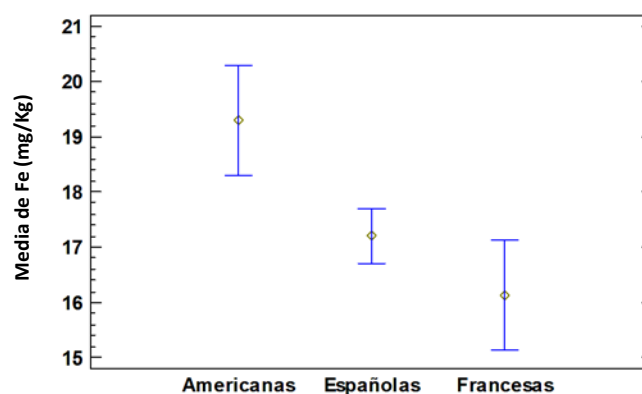


Figura 6. Intervalos de confianza para la media

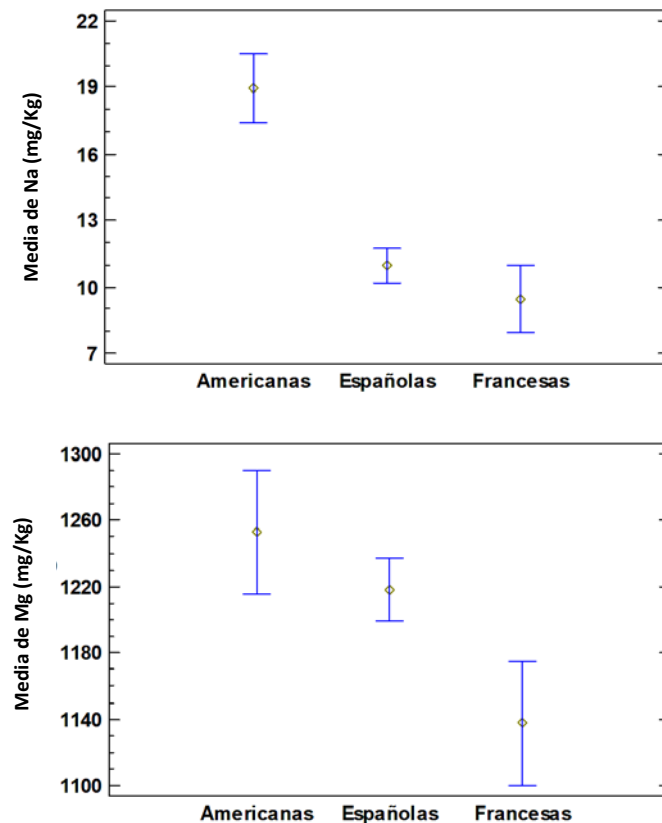


Figura 6 (cont.). Intervalos de confianza para la media

También se llevó a cabo un ANOVA con un nivel de confianza al 95% para establecer diferencias entre nueces españolas con diferente origen geográfico. En la Tabla 8 se resumen los resultados del ANOVA.

Tabla 8. Tabla del ANOVA.

| Elemento | Razón-F | Valor-p |
|----------|---------|---------|
| Fe | 8,70 | 0,0004 |
| Mn | 15,32 | 0,0000 |
| Cu | 51,02 | 0,0000 |
| Na | 3,60 | 0,0240 |
| K | 10,44 | 0,0001 |
| Mg | 5,86 | 0,0030 |
| Ca | 16,69 | 0,0000 |

El valor-p es inferior a 0,05 en todos los casos, por lo que los resultados indican que todos los metales determinados diferencian significativamente a las nueces por su origen geográfico español. En la Figura 7 se muestran los intervalos de confianza para cada metal. Considerando cada metal, las nueces de Reus presentan las concentraciones significativamente más altas de Fe comparadas con el resto de las muestras, siendo las concentraciones de las nueces de

Girona las que poseen las concentraciones de Fe más bajas. Para el caso del Cu, las nueces de Reus presentan concentraciones significativamente más altas y las de Lugo concentraciones más bajas respecto del resto de muestras. En el caso del Mn, las concentraciones más altas las presentan las nueces de Reus mientras que las concentraciones más bajas se muestran para las de la Sierra del Segura y Huelva. Como puede observarse, las nueces de Reus se diferencian significativamente del resto de las muestras por sus concentraciones más altas en Fe, Cu y Mn, esto puede ser debido a prácticas agrícolas en las que se suelen añadir estos micronutrientes. Para el Na, las concentraciones significativamente más bajas las presentan las nueces de Lugo y las de la Sierra del Segura. Las nueces de estos orígenes geográficos serían recomendables en dietas bajas en Na. Las nueces de Lugo tienen las concentraciones significativamente más altas de K. En el caso del Mg se observan menos diferencias. Por tanto, las nueces de Lugo al contener niveles altos de K y Mg y bajos en Na serían recomendables en dietas para mejorar la presión arterial. En cuanto al Ca, sólo las nueces de Lugo presentan concentraciones significativamente más bajas que el resto de las muestras.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos indican que la determinación de metales en las nueces aporta información de interés para el consumidor, con vistas a la elección de alimentos con valores nutricionales adecuados. Esta información debería presentarse en el etiquetado de productos tan importantes como las nueces.

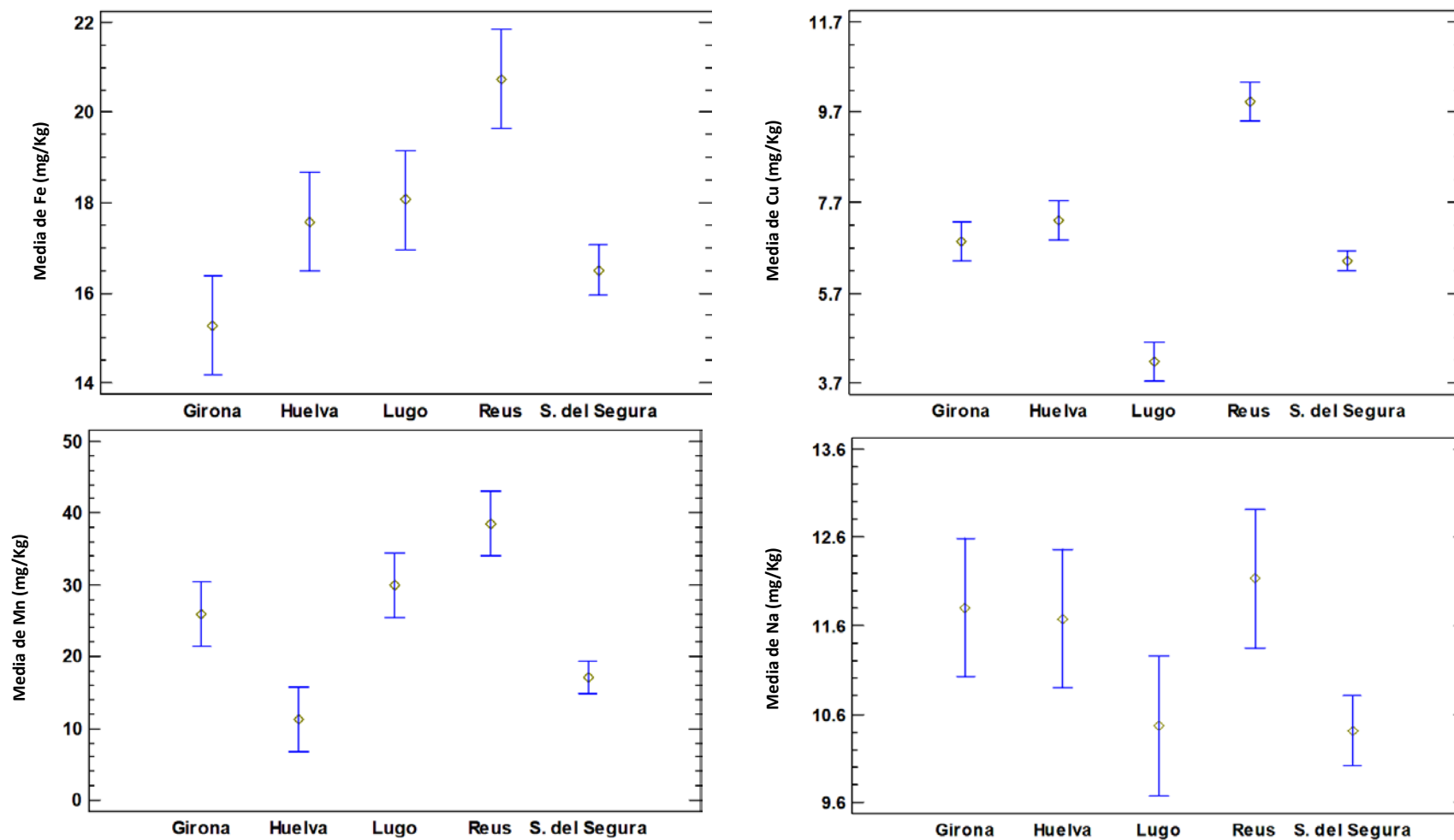


Figura 7. Intervalos de confianza para la media

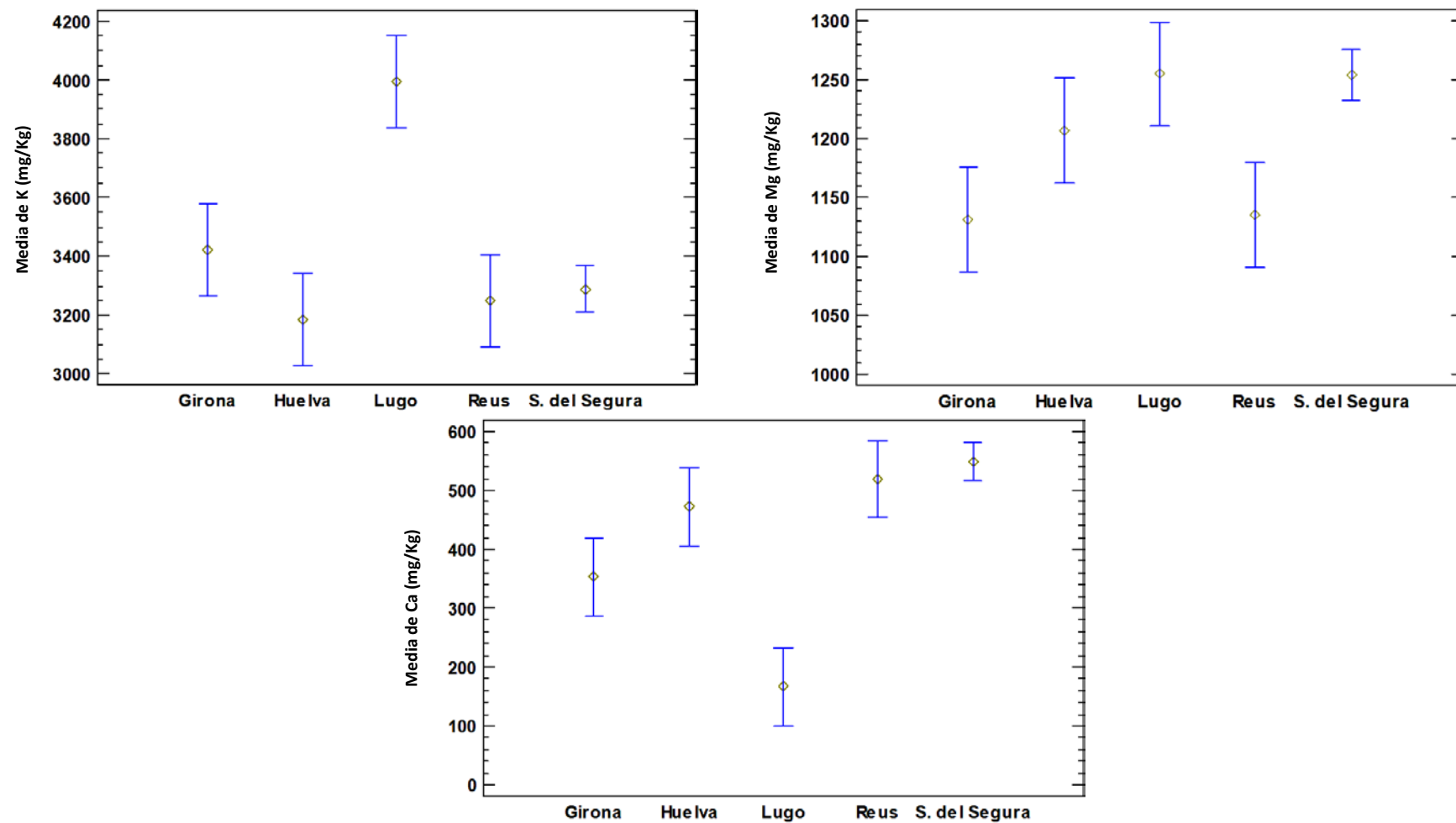


Figura 7 (cont.). Intervalos de confianza para la media

6.4. Información adicional para el consumidor de nueces

Cuando los consumidores compran nueces tienden a elegir aquellas más atractivas, con formas similares y tamaños grandes. Basándonos en un artículo donde se hace un análisis comparativo de varios cultivos de nueces [17], se llevaron a cabo la medida de algunos parámetros físicos de las nueces muestreadas. Se midieron las dimensiones de los tres ejes con el objetivo de calcular el volumen, así como el peso de la nuez entera y de la parte comestible, para calcular la relación entre ellos. La evaluación de estos parámetros puede ser de interés para el consumidor a la hora de seleccionar el producto de forma visual.

Para calcular el tamaño de las nueces se midieron sus tres dimensiones lineales: longitud (L), anchura (W) y altura (T) usando un calibre digital. En la Figura 8 se muestran las tres dimensiones. Con los datos obtenidos se determinó el volumen y el índice de forma mediante las expresiones que han sido previamente utilizadas en la bibliografía [17]:

$$V = \frac{\pi}{6}LTW$$

$$I = \frac{W + T}{2L}$$

Donde V representa el volumen en cm^3 e I representa el índice de forma que está relacionado con la esfericidad de la nuez.

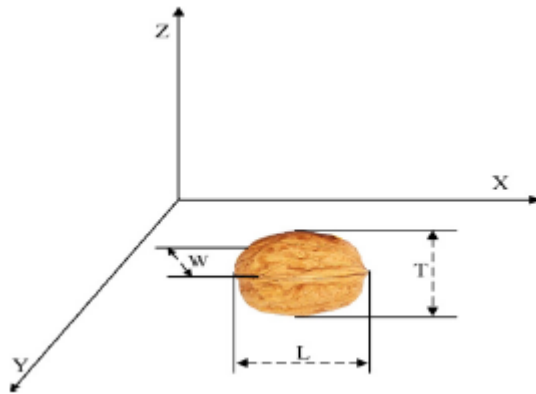


Figura 8. Disposición de la nuez sobre los ejes y asignación de las dimensiones.

Por otra parte, se pesaron las nueces enteras y su parte comestible con la finalidad de calcular la relación entre ambas. En la Figura 9 se muestra la relación de las masas, el volumen y el índice de forma anteriormente mencionados.

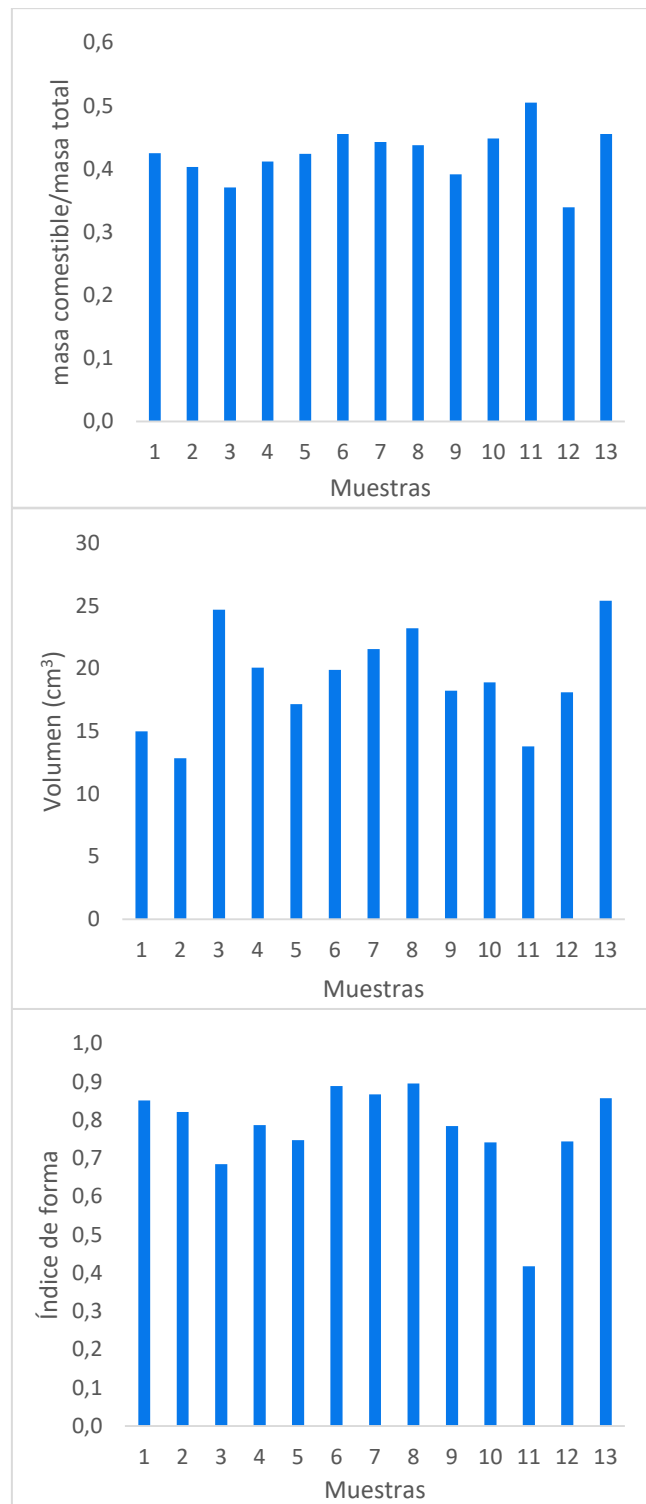


Figura 9. Parámetros físicos y gravimétricos de interés para el consumidor.

Como se observa, no existe una relación directa entre el volumen y la relación masa comestible/masa total, de hecho, se observan variaciones en los volúmenes, pero no se observan grandes diferencias en la relación de masas. Por lo tanto, un volumen mayor no implica una proporción mayor de la parte comestible. Tampoco se observa una relación entre el índice de forma y la relación de masas.

7. Conclusiones

Dado que no se han encontrado en la bibliografía métodos que sean específicos para la determinación de metales esenciales en nueces, en este trabajo se ha adaptado con éxito un procedimiento de digestión propuesto para semillas, quedando finalmente los digeridos de nueces libres de residuos sólidos y restos de grasa.

La comparación del método de las adiciones estándar frente al método de las curvas de calibrado puso de manifiesto la destrucción de la materia orgánica de las nueces, por lo que las determinaciones de los metales esenciales se llevaron a cabo libres de interferencias de matriz utilizando el método más sencillo de la curva de calibrado.

La espectroscopía de absorción atómica con llama se ha mostrado como la técnica más idónea para la determinación de metales esenciales en los digeridos de nueces, debido a su elevada selectividad, precisión, sensibilidad, con metodologías bien establecidas y por tratarse de una técnica instrumental económica.

Se precisa una revisión de la trazabilidad de las concentraciones que aparecen en las bases de datos, haciendo hincapié en el procedimiento de preparación de la muestra, así como en la técnica instrumental utilizada. Por lo tanto, es necesaria una actualización de los datos de metales esenciales en nueces y frutos secos disponibles al alcance del consumidor.

Se hace necesaria la disponibilidad de muestras de referencia certificadas para muestras de frutos secos con matrices más similares a las nueces que las que actualmente se encuentran disponibles.

Las técnicas descriptivas y estadísticas han demostrado ser una herramienta útil para diferenciar las muestras de nueces según su origen geográfico, las prácticas agrícolas empleadas y según los beneficios para la salud del consumidor.

Por último, se ha evidenciado que características visuales tan atractivas para el consumidor como un mayor volumen y una forma más esférica de los frutos secos, no conllevan a una mayor parte comestible de la nuez.

8. Bibliografía

- [1] S. Schwindl, B. Kraus, J. Heilmann, Phytochemical study of *Juglans regia* L. leaves, *Phytochemistry*. 144 (2017) 58–70. doi:10.1016/j.phytochem.2017.08.012.
- [2] S.B. Tošić, S.S. Mitić, D.S. Velimirović, G.S. Stojanović, A.N. Pavlović, E.T. Pecev-Marinković, Elemental composition of edible nuts: Fast optimization and validation procedure of an ICP-OES method, *J. Sci. Food Agric.* 95 (2015) 2271–2278. doi:10.1002/jsfa.6946.
- [3] M.L. Martínez, D.O. Labuckas, A.L. Lamarque, D.M. Maestri, Walnut (*Juglans regia* L.): Genetic resources, chemistry, by-products, *J. Sci. Food Agric.* 90 (2010) 1959–1967. doi:10.1002/jsfa.4059.
- [4] A. Jáuregui, Trabajo Fin de Grado: Desarrollo de nueces (*Juglans Regia*) de la variedad semilla california recubiertas con miel, Universidad de Chile, 2006.
- [5] S. Arranz, J. Pérez-Jiménez, F. Saura-Calixto, Antioxidant capacity of walnut (*Juglans regia* L.): contribution of oil and defatted matter, *Eur. Food Res. Technol.* 227 (2008) 425–431. doi:10.1007/s00217-007-0737-2.
- [6] M.I. Tapia, J.R. Sánchez-Morgado, J. García-Parra, R. Ramírez, T. Hernández, D. González-Gómez, Comparative study of the nutritional and bioactive compounds content of four walnut (*Juglans regia* L.) cultivars, *J. Food Compos. Anal.* 31 (2013) 232–237. doi:10.1016/j.jfca.2013.06.004.
- [7] A. Jack, Nutrient Guide. Food Composition Tables for more than 400 natural and conventional foods, Amberwaves, 2011.
- [8] D.R. Davis, M.D. Epp, H.D. Riordan, D.R. Davis, Changes in USDA Food Composition Data for 43 Garden Crops, 1950 to 1999, *J. Am. Coll. Nutr.* 23 (2004) 669–682. doi:10.1080/07315724.2004.10719409.
- [9] A. Jack, AMERICA'S VANISHING NUTRIENTS Decline in Fruit and Vegetable Quality Poses Serious Health and Environmental Risks, Amberwaves, 2005.
- [10] J. Portillo, Los alimentos mostrarán su calidad nutricional con discos de colores en el etiquetado, *El País*. (2018). (accessed November 12, 2018). https://elpais.com/sociedad/2018/11/12/actualidad/1542039559_595446.html

- [11] L. Delle Femmine, Empieza la cuenta atrás para el polémico sistema de etiquetado diseñado por las empresas, El País. (2018). (accessed November 14, 2018).
https://elpais.com/sociedad/2018/11/07/actualidad/1541607428_947724.html
- [12] I. Sota, Sanidad responde a las críticas del nuevo etiquetado de alimentos: “El aceite no tendrá que llevar NutriScore,” El País. (2018). (accessed November 20, 2018).
https://elpais.com/elpais/2018/11/16/buenavida/1542368171_726260.html?rel=mas
- [13] A.A. Momen, G.A. Zachariadis, A.N. Anthemidis, J.A. Stratis, Use of fractional factorial design for optimization of digestion procedures followed by multi-element determination of essential and non-essential elements in nuts using ICP-OES technique, *Talanta*. 71 (2007) 443–451. doi:10.1016/j.talanta.2006.04.018.
- [14] P. Fuentes, Trabajo Fin de Grado: Determinación de fósforo en nueces y establecimiento de la fracción asimilable, Universidad de Cádiz, 2017.
- [15] F. Lavedrine, A. Ravel, A. Villet, V. Ducros, J. Alary, Mineral composition of two walnut cultivars originating in France and California, *Food Chem.* 68 (2000) 347–351. doi:10.1016/S0308-8146(99)00204-6.
- [16] I. Rodushkin, E. Engström, D. Sörlin, D. Baxter, Levels of inorganic constituents in raw nuts and seeds on the Swedish market, *Sci. Total Environ.* 392 (2008) 290–304. doi:10.1016/j.scitotenv.2007.11.024.
- [17] S.M.T. Gharibzahedi, S.M. Mousavi, M. Hamed, F. Khodaiyan, Comparative analysis of new Persian walnut cultivars: Nut/kernel geometrical, gravimetric, frictional and mechanical attributes and kernel chemical composition, *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 135 (2012) 202–209. doi:10.1016/j.scienta.2011.11.030.
- [18] C. Cabrera, F. Lloris, R. Giménez, M. Olalla, M.C. López, Mineral content in legumes and nuts: Contribution to the Spanish dietary intake, *Sci. Total Environ.* 308 (2003) 1–14. doi:10.1016/S0048-9697(02)00611-3.
- [19] L. Munro, Ebdon, Seumas, D.J. McWeeny, Application of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) for Trace Metal Determination in Foods, *J. Anal. At. Spectrom.* 1 (1986) 211–219.
- [20] C. Cámara, P. Fernandez, A. Martín-Esteban, C. Pérez-Conde, M. Vidal, Toma y tratamiento de muestras, Editorial Síntesis SA., Madrid, 2002.

- [21] M. Plessi, D. Bertelli, A. Monzani, M.S. Simonetti, A. Neri, P. Damiani, Dietary Fiber and Some Elements in Nuts and Wheat Brans, *J. Food Compos. Anal.* 12 (1999) 91–96. doi:10.3109/03639048609042628.
- [22] M. Grembecka, E. Malinowska, P. Szefer, Differentiation of market coffee and its infusions in view of their mineral composition, *Sci. Total Environ.* 383 (2007) 59–69. doi:10.1016/j.scitotenv.2007.04.031.
- [23] G.M. Lo Dico, F. Galvano, G. Dugo, C. D’ascenzi, A. Macaluso, A. Vella, G. Giangrosso, G. Cammilleri, V. Ferrantelli, Toxic metal levels in cocoa powder and chocolate by ICP-MS method after microwave-assisted digestion, *Food Chem.* 245 (2018) 1163–1168. doi:10.1016/j.foodchem.2017.11.052.
- [24] D. Frutos Tomás, Algunos datos para el cultivo del nogal como especie frutal: Material vegetal, poda y sistemas de plantación, *Frutic. Prof.* 11 (1897) 50–54.
- [25] M. Valcárcel, A. Ríos, *La calidad en los laboratorios analíticos*, Editorial Reverté SA., Barcelona, 1992.
- [26] G. Ramis Ramos, M.C. García Álvarez-Coque, *Quimiometría, Síntesis*, Madrid, 2001.
- [27] J.O. De Beer, B.M.J. De Spiegeleer, J. Hoogmartens, I. Samson, D.L. Massart, M. Moors, Relationship between content limits and assay methods: an interlaboratory statistical evaluation, *Analyst.* 117 (1992) 933–940. doi:10.1039/an9921700933.
- [28] M. Thompson, B. Mertens, M. Kessler, T. Fearn, Efficacy of robust analysis of variance for the interpretation of data from collaborative trials, *Analyst.* 118 (1993) 235–240. doi:10.1039/an9931800235.
- [29] J.C. Miller, J.N. Miller, R. Izquierdo Hornillos, C. Maté Jimenez, *Estadística para química analítica*, Addison-Wesley, Wilmington, 1993.
- [30] R.L. Wasserstein, N.A. Lazar, The ASA’s Statement on p-Values: Context, Process, and Purpose, *Am. Stat.* 70 (2016) 129–133. doi:10.1080/00031305.2016.1154108.

9. Anexos

Anexo 1. Etiquetado de alimentos: El semáforo nutricional



Anexo 2. Elementos esenciales en algunos alimentos de la dieta mediterránea en mg/100g.

| | | Fe | Cu | Mn | Na | K | Mg | Ca |
|---------------------|------------------------|------|------|------|------|------|-----|-----|
| Verduras | Espinacas | 2,71 | 0,13 | 0,90 | 79 | 558 | 79 | 99 |
| | Brócoli | 0,73 | 0,05 | 0,21 | 33 | 316 | 21 | 47 |
| | Pimiento verde | 0,34 | 0,07 | 0,12 | 3 | 175 | 10 | 10 |
| Legumbres | Alubias blancas | 7,73 | 0,64 | 1,28 | 12 | 1542 | 183 | 173 |
| | Lentejas | 6,51 | 0,75 | 1,39 | 6 | 677 | 47 | 35 |
| | Guisantes | 1,47 | 0,18 | 0,41 | 5 | 244 | 33 | 25 |
| Frutos secos | Almendras | 3,71 | 1,03 | 2,18 | 1 | 733 | 270 | 269 |
| | Avellanas | 4,70 | 1,73 | 6,18 | 0 | 680 | 163 | 114 |
| | Pistachos | 3,92 | 1,30 | 1,20 | 1 | 1025 | 121 | 105 |
| | Nueces | 2,91 | 1,59 | 3,41 | 2 | 441 | 158 | 98 |
| Lácteos | Leche entera | 0,03 | 0,03 | 0,01 | 43 | 132 | 10 | 113 |
| | Yogur | 0,05 | 0,01 | 0,01 | 46 | 155 | 12 | 121 |
| | Mantequilla | 0,02 | 0,00 | 0,00 | 643 | 24 | 2 | 24 |
| | Queso | 0,56 | 0,03 | 0,03 | 1809 | 91 | 30 | 662 |